



UNIVERSITA' DI PISA
Dipartimento di Farmacia

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA
IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

Tesi di Laurea

**“Sviluppo e validazione di un metodo HPLC per la
determinazione del cimicoxib nel plasma canino e studio
farmacocinetico preliminare”**

Candidata:

ZOCCHI Martina

Relatori:

Prof. GIORGI Mario

Dott.ssa. DE VITO Virginia

Anno Accademico 2013/2014

INDICE

Riassunto/Abstract

1. Introduzione	p.1
1.1. L'inflammazione	p.1
1.1.1. Autacoidi dell'inflammazione	p.3
1.1.2. Eicosanoidi: struttura, biosintesi e vie metaboliche	p.5
1.1.3. Via delle cicloossigenasi	p.7
1.2. Farmaci anti-infiammatori	p.13
1.2.1. Fans	p.15
1.2.2. Fans tradizionali	p.18
1.2.3. I COXIBs	p.27
1.2.3.1. Effetti farmacologici, effetti collaterali ed usi clinici	p.30
1.2.4. COXIBs di prima generazione	p.32
1.2.4.1. Celecoxib	p.32
1.2.4.2. Rofecoxib	p.33
1.2.5. COXIBs di seconda generazione	p.34
1.2.5.1. Firocoxib	p.34
1.2.5.2. Deracoxib	p.36
1.2.5.3. Mavacoxib	p.37

1.2.5.4.	Robenacoxib	p.38
1.2.5.5.	Cimicoxib	p.41
2.	Scopo della tesi	p.44
3.	Materiali e metodi	p.45
3.1.	Chimica e reagenti	p.45
3.2.	Soluzioni standard e rette di taratura	p.45
3.3.	Strumentazione e condizioni cromatografiche	p.46
3.3.1.	HPLC-FL	p.46
3.3.2.	HPLC-MS	p.48
3.4.	Trattamento cani e raccolta campioni	p.48
3.5.	Estrazione	p.50
3.6.	Validazione bioanalitica del metodo	p.52
3.7.	Determinazione delle concentrazioni di analita nei campioni	p.53
3.8.	Valutazione farmacocinetica	p.55
4.	Risultati	p.56
4.1.	Sviluppo del metodo di rivelazione	p.56
4.2.	Ottimizzazione del metodo di estrazione	p.57
4.3.	HPLC-FL: cromatogrammi	p.58

4.4. Validazione del metodo	p.62
4.5. Farmacocinetica	p.65
5. Discussione	p.68
6. Conclusioni	p.73
7. Bibliografia	p.74

Riassunto

Parole chiave: Cimicoxib, HPLC, plasma canino, farmacocinetica.

Il cimicoxib è un inibitore selettivo della COX-2 di recente rilascio, utilizzato per l'infiammazione e il dolore nel cane. Non essendo presenti in letteratura studi relativi a questa molecola, gli obiettivi del presente studio sono stati quelli di: 1) sviluppare e validare un metodo analitico per la determinazione del cimicoxib nel plasma di cane; 2) valutare la sua farmacocinetica in 5 cani. Il farmaco è stato somministrato per via orale (compresse appetibili) a due diversi dosaggi: gruppo A (n=1) 4 mg/kg; gruppo B (n=4) 2 mg/Kg.

Il dispositivo utilizzato per la quantificazione dell'analita è stato l'HPLC accoppiato con rivelatore a fluorescenza.

Il limite di quantificazione per il cimicoxib è stato di 10 ng/mL. Le corse cromatografiche sono state specifiche, senza picchi di interferenza nei tempi di ritenzione dell'analita, come confermato mediante esperimenti di LC-MS/MS. La validazione del metodo è stata determinata in accordo con le linee guida dell'European Medicines Evaluation Agency (EMA). Non è stato rilevato alcun effetto avverso visibile negli animali dopo singolo dosaggio.

La metodica di determinazione del cimicoxib presente in questo studio, ha permesso la piena valutazione del profilo farmacocinetico del cimicoxib ed il calcolo dei maggiori parametri farmacocinetici.

In conclusione, la presente metodica HPLC si è rivelata rapida, sensibile, economica, e potrà quindi essere utilizzata per ulteriori studi sulla farmacocinetica di questa molecola nelle specie veterinarie.

Abstract

Keywords: Cimicoxib, HPLC, plasma canine, pharmacokinetics.

The cimicoxib is a selective COX-2 inhibitor recently launched on the veterinary drug market, for inflammation and pain in the dog. Since there are no studies related to this molecule in the literature, the purposes of this study was twofold 1) to develop and validate an analytical method for the determination of cimicoxib in the canine plasma, 2) to evaluate its preliminary pharmacokinetics in five dogs.

Palatable tablets of cimicoxib have been used in two different doses administered orally: group A (n=1) 4 mg/Kg, group B (n=4) 2 mg/Kg.

The system used for the quantification of the drug was the HPLC coupled with a fluorescence detector.

The limit of quantification for the cimicoxib was 10 ng/mL. The chromatographic runs were specific, with no interfering peaks at the retention time of the analytes, as confirmed by LC-MS/MS. The validation of the method was in agreement with the guidelines of the European Medicines Evaluation Agency (EMA).

Not visible adverse effect was detected in animals after single cimicoxib administration.

The present method, has allowed to fully describe the pharmacokinetic profile of the drug and the calculation of the main pharmacokinetic parameters.

In conclusion, the present HPLC method is rapid, accurate and economical. It can then be used for further pharmacokinetic explorations in other animal species.

1.Introduzione

1.1 L'INFIAMMAZIONE

L'infiammazione, detta anche flogosi, è un complesso di eventi vascolari e cellulari che nell'insieme costituiscono la risposta di un qualsiasi tessuto vascolarizzato ad un danno di varia natura (fisica, chimica, biologica, etc.). Questo processo può essere visto come un tentativo da parte dell'organismo di neutralizzare e rimuovere l'agente causale e favorire la riparazione del danno, ripristinando così la normale struttura e funzionalità del tessuto stesso.

L'infiammazione è classificata secondo un criterio temporale in *infiammazione acuta* o *angioflogosi* (avvio immediato: da minuti a pochi giorni), e *infiammazione cronica* o *istoflogosi* (durata molto variabile: da giorni ad anni). L'angioflogosi può essere risolta completamente in seguito alla rimozione dell'agente nocivo, o in alternativa, portare ad altre conseguenze più gravi, tra cui l'istoflogosi. Normalmente l'infiammazione si articola come una risposta immunologica antigene-anticorpo con la seguente successione di eventi:

- Vasodilatazione: il danno tissutale dà luogo al rilascio di mediatori cellulari (**autacoidi**) che provocano la vasodilatazione, al fine di ridurre la velocità del flusso sanguigno attraverso l'aumento della pressione idrostatica. La vasodilatazione inoltre aiuta i leucociti a disporsi lungo le pareti dei vasi. I mediatori coinvolti sono: istamina, prostaciline (PGI_2) ed ossido di azoto (NO).
- Aumento della permeabilità vascolare: causato dal rilascio di istamine, leucotrieni (C_4 , D_4 , E_4), bradichinine, fattore di necrosi tumorale (TNF) e interleuchine (IL-1). L'aumento della permeabilità causa il passaggio dei fluidi all'interstizio che permette l'aumento del livello proteico interstiziale. Questo

determina una diminuzione della pressione del sangue e aumenta la pressione osmotica nell'interstizio, causando un ulteriore travaso di fluidi all'interstizio che porta a edema.

- Migrazione dei globuli bianchi dai vasi ai tessuti molli infiammati con formazione di nuovi tessuti cicatrizzanti e modificazione della forma delle articolazioni.

In linea generale, l'infiammazione ha per l'organismo un significato protettivo e difensivo. A volte però la flogosi può assumere una connotazione patologica. Ciò può verificarsi sia quando il danno è particolarmente grave e la reazione particolarmente estesa; quando la reazione è innescata in modo anomalo contro sostanze esogene altrimenti innocue (malattie allergiche); contro gli stessi tessuti dell'organismo (malattie autoimmuni); quando, nell'impossibilità di rimuovere la causa flogogena di base, il processo infiammatorio si cronicizza (malattie degenerative e immuno-mediate), con produzione di mediatori e migrazione cellulare incontrollate. In tutti questi casi, l'infiammazione può arrecare danni anche gravi all'individuo, sia per il danno tissutale che essa stessa provoca che per il dolore che ad essa si associa. Nel caso in cui siano interessati organi vitali o l'organismo sia coinvolto in maniera generalizzata, l'infiammazione può mettere in pericolo la vita del paziente. In tali circostanze è necessario l'utilizzo di farmaci che siano in grado di ridurre la risposta infiammatoria in atto o, quantomeno, alcune delle sue manifestazioni [Zizzadoro e Belloli, 2009]. Clinicamente, i sintomi dell'infiammazione sono:

- calore (*calor*), aumento della temperatura locale dovuto all'aumentata vascolarizzazione;

- arrossamento (*rubor*), dovuto all'iperemia attiva e all'aumentato metabolismo cellulare;
- tumefazione (*tumor*), gonfiore determinato dalla formazione dell'essudato e dell'edema;
- dolore (*dolor*), indolenzimento provocato dalla compressione e dall'intensa stimolazione delle terminazioni sensitive da parte dell'agente infiammatorio e dei componenti dell'essudato;
- alterazione funzionale (*functio laesa*) della zona colpita.

1.1.1 Autacoidi dell'infiammazione

Il termine "autacoide" letteralmente significa "auto-medicamento" o "auto-rimedio"; dal greco *autos* = proprio o da sé + *akos* = rimedio o agente medicinale.

Come gli ormoni, gli autacoidi sono fattori umorali della comunicazione intercellulare, ma esercitano la loro azione su bersagli locali raggiunti per diffusione negli spazi interstiziali e rappresentati da cellule vicine alla sede di produzione (azione paracrina) e/o dalle stesse cellule produttrici (azione autocrina); sono pertanto indicati come "ormoni locali". Gli autacoidi, infatti, sono soggetti a rapida inattivazione nell'ambiente extracellulare (per instabilità chimica e/o per azione di enzimi metabolizzanti presenti nei tessuti) e normalmente non riescono a raggiungere nel torrente circolatorio concentrazioni sufficienti ad espletare azioni su bersagli lontani. Gli autacoidi, intervengono attivamente nella regolazione di tutti quei fenomeni biologici che necessitano di una coordinazione locale. La reazione infiammatoria e la risposta immunitaria sono le condizioni in cui tale necessità si esprime in maniera esemplare e

nelle quali, pertanto, gli autacoidi svolgono il ruolo di protagonisti. Gran parte di queste sostanze vengono prodotte e/o rilasciate in risposta ad insulti di varia natura e, in virtù della loro capacità di modulare le attività funzionali e proliferative di svariati bersagli cellulari, sono i diretti responsabili del complesso di fenomeni vascolari (vasodilatazione, aumento della permeabilità, etc.) e cellulari (attivazione e migrazione leucocitaria, proliferazione e differenziazione linfocitaria, de granulazione, etc) attraverso i quali i tessuti animali si difendono da una aggressione e riparano il danno eventualmente subito. In maniera del tutto simile, anche il processo emostatico, complesso di eventi innescati in seguito alla perdita di integrità della parete vasale (vasocostrizione, aggregazione piastrinica, coagulazione del sangue, etc.), è mediato da sostanze endogene classificabili come autacoidi, sintetizzate e/o rilasciate all'occorrenza. In relazione alla centralità del ruolo funzionale svolto in così numerosi processi fisiologici e fisio-patologici, molti autacoidi rappresentano un importante "bersaglio" di azione farmacologica [Zizzadoro e Belloli, 2009].

Gli autacoidi sono classificati per categorie chimiche in:

Autacoidi amminici: istamina [2-(4-imidazolil)etilamina], serotonina (5-idrossitriptamina);

Autacoidi lipidici: **eicosanoidi** (prostaglandine o PG, prostacicline, leucotrieni, trombossani, lipossine, epossilene), fattore di attività piastrinica o PAF;

Autacoidi peptidici: fattori di crescita non emopoietici (EGF Epidermal Growth Factor, NGF Nerve Growth Factor), citochine (interleuchine IL, interferoni IFN, fattore di necrosi tumorale TNF_α);

Altri autacoidi: Ossido Nitrico (NO), radicali liberi dell'ossigeno o ROS.

1.1.2 Eicosanoidi: struttura, biosintesi e vie metaboliche

I precursori biosintetici degli eicosanoidi sono alcuni acidi grassi polinsaturi a 20 atomi di carbonio, rappresentati in particolare dall'acido diomo- γ -linoleico, acido arachidonico e acido timodonico che contengono rispettivamente 3, 4 e 5 doppi legami. Nella maggior parte delle specie animali, l'**acido arachidonico (AA) (Fig.1)** è il precursore più abbondante e, pertanto, gli eicosanoidi si identificano in larga misura con i derivati di questo acido grasso.

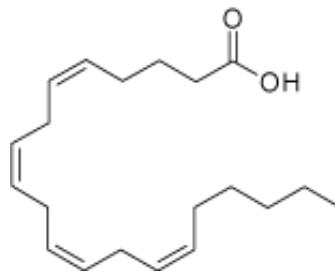


Fig.1 - Struttura dell'acido arachidonico (AA)

Nei tessuti, l'AA, si ritrova prevalentemente nei fosfolipidi delle membrane cellulari, esterificato con l'ossidrile in posizione 2 dello scheletro carbonioso del glicerolo. Affinché la sintesi degli eicosanoidi possa avere luogo, è necessario, però, che l'AA venga liberato dai fosfolipidi di membrana. Principale responsabile di tale evento è l'enzima *fosfolipasi A₂* (PLA₂), che catalizza in maniera specifica l'idrolisi del legame estereo in posizione 2 del glicerolo (**Fig.2-3**).

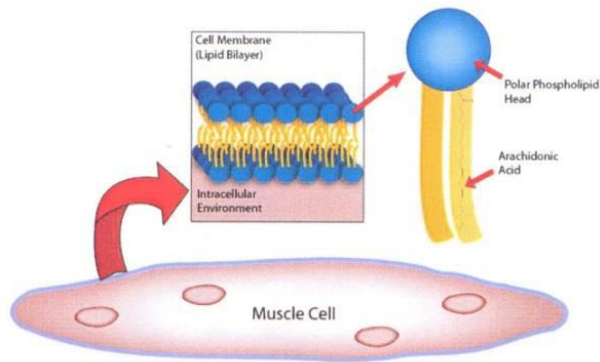


Fig.2 - La “liberazione dell’acido arachidonico.

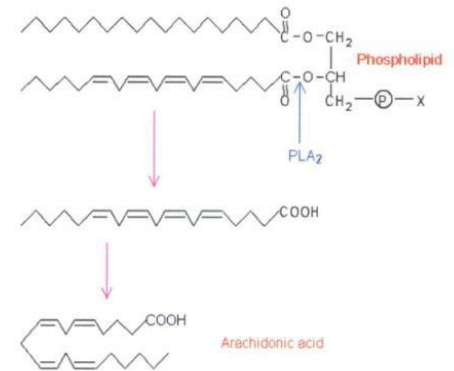


Fig.3 - Reazione chimica: da fosfolipide ad AA.

Gli stimoli che attivano questo enzima sono di diversa natura (fisici, chimici o biologici; fisiologici o patologici; endogeni o esogeni; etc.): alcuni agiscono tramite specifici recettori (ormoni, neurotrasmettitori, autacoidi, allergeni, endotossina batterica, etc.), mentre altri provocano un’aspecifica perturbazione cellulare (traumi, shock termico, ipossia, etc.).

L’AA così liberato viene trasformato nelle diverse classi di eicosanoidi per intervento di specifici sistemi enzimatici, che catalizzano reazioni biochimiche sequenziali in cui il prodotto di una reazione funge da substrato per la reazione successiva (cosiddetta **cascata dell’acido arachidonico**). Le vie metaboliche lungo le quali l’AA viene metabolizzato sono essenzialmente tre e prendono il nome, ciascuna, dagli enzimi che intervengono per primi nella catena di reazioni, utilizzando direttamente l’AA come substrato.

Si distinguono in particolare:

- 1) la via delle **cicloossigenasi (COX)**, che porta alla formazione dei *prostanoidi* (**Fig.4**);

- 2) la via delle lipoossigenasi (LOX), che porta alla formazione di *leucotrieni* e di altri composti correlati (lipossine, epossine e vari idrossi-perossi e idrossi-acidi).
- Le LOX costituiscono una vasta famiglia di enzimi che catalizzano l'ossigenazione dell'AA, trasformandolo in un idro-perossi-acido (acido idro-perossi-eicosa-tetraenico o HPETE). In base alla specifica posizione in cui l'enzima introduce l'ossigeno molecolare nella catena carboniosa dell'acido grasso, si distinguono diversi tipi di LOX (5-, 8-, 9-, 11-, 12-, e 15-LOX), che portano alla formazione dei rispettivi HPETE, di cui i più importanti negli organismi animali sono il 5-, 12-, e 15-HPETE. Quindi, per l'attività deidrasica delle LOX (enzimi ad attività bifunzionale) sono ulteriormente trasformati nei diversi leucotrieni (LT) (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄, CysLT) e nelle lipossine (LXA₄, LXB₄) (**Fig.4**).
- 3) la via delle citocromo P450 (PY450) monoossigenasi, che porta alla formazione di vari idrossi- ed epossidi-acidi (**Fig.4**).

1.1.3 Via delle cicloossigenasi

Gli enzimi che catalizzano l'avvio delle reazioni biochimiche che portano alla formazione dei prostanoidi si identificano nelle cicloossigenasi (definite anche prostaglandino-G/H-sintasi o PGHS). Questi enzimi sono proteine globulari associate al versante luminale delle membrane del reticolo endoplasmatico e del nucleo, capaci di due attività catalitiche, cicloossigenasica e perossidasi (enzimi bifunzionali), che si svolgono in altrettanti siti attivi strutturalmente distinti:

- nel sito ad **attività cicloossigenasica**, l'AA viene trasformato nell'endoperossido ciclico prostaglandina G_2 (PGG_2), in seguito a di-ossigenazione e ciclizzazione della sua catena carboniosa;
- nel sito ad **attività perossidasi**, la PGG_2 viene trasformata in un secondo endoperossido ciclico, la prostaglandina H_2 (PGH_2), per riduzione del gruppo idrossido (-OH).

La PGH_2 , composto intermedio altamente reattivo, per intervento di specifici enzimi (PGD -, PGE -, PGF -, PGI - e TXA -sintasi), viene a sua volta trasformata in una serie di prodotti terminali biologicamente attivi, che si diffondono passivamente nell'ambiente extracellulare, indicati nell'insieme come **prostanoidi**, e rappresentati da:

- **prostaglandine D_2 , E_2 e $F_2\alpha$** (PGD_2 , PGE_2 e $PGF_2\alpha$),
- **prostaciclina** (o prostaglandina I_2 , PGI_2),
- **trombossano A_2** (TAX_2).

Con particolare riferimento alla struttura molecolare ed alla nomenclatura dei prostanoidi, si può ricordare che (**Fig.4**):

- tutti i prostanoidi sono composti ciclizzati e quindi caratterizzati dalla presenza di un anello all'interno della loro struttura;
- le lettere che contraddistinguono i singoli composti (A, D, E, F, G, H, I) fanno riferimento a gruppi chimici funzionali sulla struttura anulare di base;
- la numerazione in pedice indica il numero di doppi legami presenti nelle catene carboniose laterali della molecola e dipende dall'acido grasso polinsaturo precursore: 2 per tutti i prostanoidi derivati dall'acido arachidonico (composti

dienoici), 1 e 3 per i prostanoidi derivati dall'acido linoleico e timodonic (composti mono- e tri-enoici).

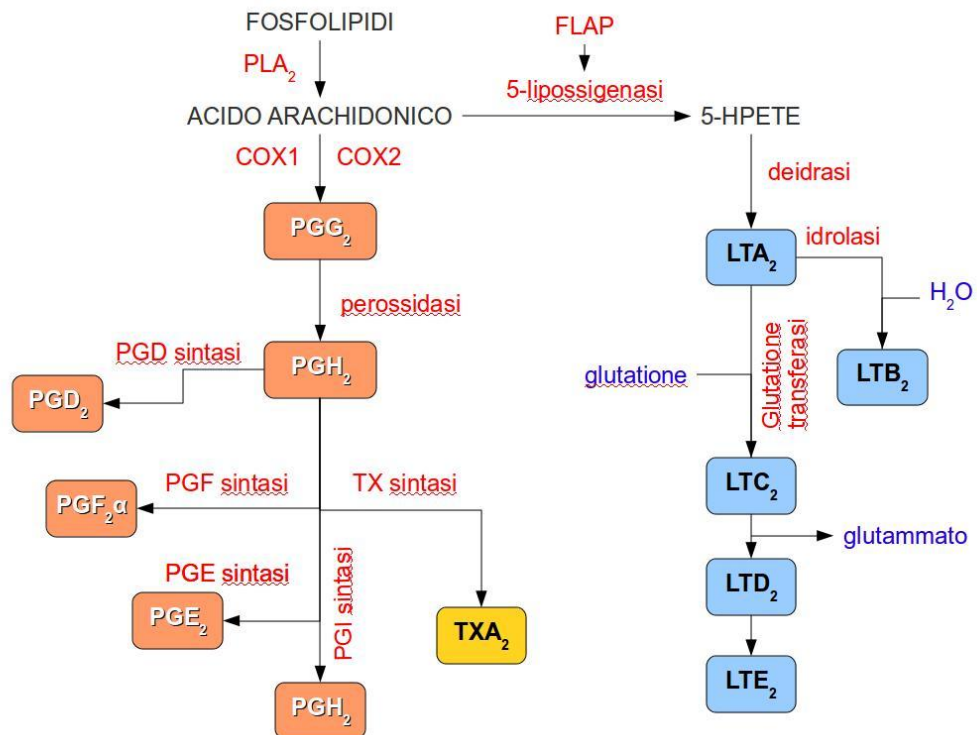


Fig.4 - Via metabolica delle cicloossigenasi (COX).

Le cicloossigenasi

Le cicloossigenasi (COX), che catalizzano la conversione dell'AA in PGH₂, rappresentano una famiglia di enzimi di cui si conoscono almeno due diverse forme molecolari: la cicloossigenasi 1 (COX-1) e la cicloossigenasi 2 (COX-2). Sul piano funzionale, i due isoenzimi svolgono la stessa attività catalitica, agendo sullo stesso substrato, l'AA, e sono molto simili anche relativamente alla composizione aminoacidica (omologia del 60% circa). Alcune importanti differenze strutturali si osservano invece a carico del sito dell'attività cicloossigenasica (**Fig.5**) e sono essenzialmente responsabili della

differenti specificità dei due enzimi verso altri substrati e della loro diversa sensibilità all'inibizione farmacologica.

Il sito attivo consiste in un canale idrofobico lungo e stretto che si estende dalla parte sferica verso il centro catalitico [Luong et al., 1996; Smith e Song, 2002]. Il canale della COX-2 è più largo e possiede una forma leggermente differente da quello delle COX-1. Queste differenze fanno sì che si formi una piccola tasca laterale idrofobica fuori dal canale principale, aumentando il volume del sito attivo della COX-2. All'interno della tasca laterale della COX-2 è presente un residuo di arginina al posto dell'His-513 presente nella catena laterale della COX-1 (**Fig.5**) [Rao et al., 2005].

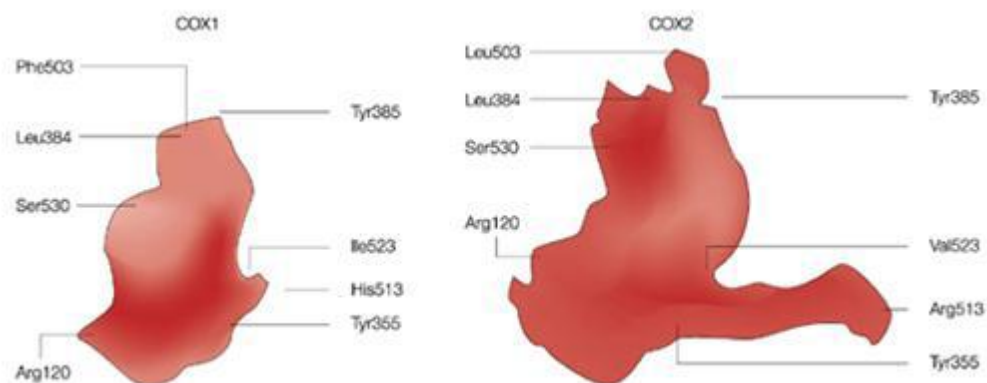


Fig.5 - Sequenza degli amminoacidi nella COX-1 e nella COX-2 [Flower, 2003].

Le differenze principali tra le due isoforme per quanto riguarda la distribuzione cellulare e meccanismi di regolazione della loro espressione molecolare sono:

- la COX-1, normalmente presente, in normali condizioni fisiologiche, nella quasi totalità delle cellule e dei tessuti dell'organismo animale, è chiamata anche "isoforma costitutiva"; il suo livello di espressione, è in genere costante, sebbene con piccole variazioni;

- la COX-2, chiamata anche “isoforma inducibile”, in condizioni basali è espressa in maniera costitutiva solo in alcuni tessuti (come cervello, pareti vasali, rene), mentre nella maggior parte delle cellule è virtualmente assente [Mitchell et al., 1993; Seibert et al., 1995; 1997; Crofford, 1997]. La sua espressione diventa apprezzabile, soprattutto nelle cellule coinvolte nell’infiammazione (monociti/macrofagi, granulociti, mastociti, fibroblasti,etc.), solo dopo esposizione a stimoli adeguati (stimoli pro-infiammatori, mitogeni, fattori di crescita, ormoni, sollecitazioni meccaniche, etc.). Quando indotta, la COX-2 generalmente raggiunge livelli di espressione di gran lunga superiori (da 10 a 100 volte) a quelli della COX-1 presente nell’ambito dello stesso contesto cellulare e/o tissutale e si associa alla produzione di maggiori quantitativi di prostanoidei (fino a 100 volte).

Stabilito che COX-1 e COX-2 svolgono lo stesso tipo di attività enzimatica (sintesi di PGH_2), da tempo ci si interroga su quali possano essere le motivazioni dell’esistenza di due isoforme diverse dello stesso enzima. Inizialmente si riteneva che i due isoenzimi fossero deputati alla produzione di prostanoidei con ruoli biologici differenti ed in particolare:

- la COX-1, vista la sua espressione costitutiva, presiedesse alla produzione di prostanoidei regolatori di funzioni fisiologiche (es: citoprotezione gastrica);
- la COX-2, visti gran parte degli stimoli che ne inducono l’espressione, quindi pro-infiammatori, presiedesse alla produzione di prostanoidei mediatori di funzioni fisio-patologiche (in particolare dell’infiammazione).

Questa ipotesi si è però verificata troppo semplicistica, visto che i prostanoidei prodotti via COX-1 possono essere coinvolti anche in processi fisio-patologici (es: aggregazione

piastrinica, mediata, almeno in parte, dalla produzione COX-1 dipendente da TXA_2) e prostanoidi prodotti via COX-2 possono partecipare alla regolazione del normale funzionamento di organi e tessuti (es: ovulazione, associata all'induzione ciclica di COX-2 ed alla correlata produzione di PGE_2).

Le attuali conoscenze suggeriscono che l'esistenza di COX diverse e potenzialmente co-esprese in una stessa cellula possa servire a modulare la produzione locale di prostanoidi in termini quantitativi e temporali (tempo di insorgenza e durata). Così:

- le isoforme costitutive (COX-1 e in minore misura COX-2), garantirebbero una produzione di prostanoidi immediata (entro pochi minuti) e generalmente limitata nel tempo, in risposta a stimoli intermittenti e/o fugaci di natura fisiologica (es: neurotrasmettitori, ormoni circolanti, autacoidi, etc.) o patologica (es: il danno vasale che innesca l'aggregazione piastrinica);
- le isoforme inducibili (in prevalenza COX-2), che richiedono ovviamente tempi più lunghi affinché la loro attività si manifesti (almeno 2-4 ore), assicurerebbero una riduzione di prostanoidi duratura e generalmente abbondante in risposta a stimoli particolarmente intensi e/o persistenti, fisiologici (es: l'influenza ormonale responsabile di induzione di COX-2 e sintesi di prostaglandine in concomitanza del parto) o patologici (es: produzione iniziale di prostanoidi pro-infiammatori COX-1 mediata, sostenuta nel tempo ed incrementata dall'induzione della COX-2) [Zizzadoro e Belloli, 2009].

Inoltre, va ricordato che altre ricerche relativamente recenti documentano l'esistenza di almeno tre varianti dell'enzima COX-1, cioè di tre altri prodotti di trascrizione derivati dallo stesso gene che codifica per la COX-1. Una di queste varianti è oggi considerata una vera e propria terza forma molecolare di COX e viene indicata come

COX-3 [Chandrasekharan et al, 2002]. Altri studi, infine, suggeriscono l'esistenza anche di alcune varianti della COX-2. Poiché è noto da tempo che il paracetamolo possiede attività analgesica e antipiretica ma scarsa attività anti-infiammatoria, l'identificazione di questa terza isoforma potrebbe essere utile per spiegare il suo meccanismo d'azione. Si ipotizza infatti che l'attività antipiretica-analgesica ma non antinfiammatoria sia dovuta ad una azione inibitoria sulla sintesi di prostaglandine mediante inibizione della COX-3 a livello del SNC [Rao et al., 2005]. La comprensione del significato biologico di queste varianti potrà mettere in luce nuovi aspetti della fisiologia e fisiopatologia di certi tessuti e, pertanto, aprire nuove prospettive nella terapia farmacologica.

1.2 FARMACI ANTI-INFIAMMATORI

Farmaci che consentono di controllare l'infiammazione (o alcune sue manifestazioni) con particolare efficacia terapeutica e nelle condizioni cliniche più diverse in termini di eziologia, stadio evolutivo, gravità, localizzazione, specie animale e singolo individuo, vengono indicati come farmaci anti-infiammatori. Attualmente i farmaci che rispondono a questa definizione sono rappresentati da due classi di composti: i *glucocorticoidi* (GC; farmaci anti-infiammatori a struttura steroidea – FAS) e i *farmaci anti-infiammatori non steroidei* (FANS).

Nel caso dei GC, l'attività anti-infiammatoria deriva dalla loro capacità di interferire con la sintesi, il rilascio e/o l'azione di più mediatori contemporaneamente (soprattutto citochine ed eicosanoidi, ma anche nitrossido, ROS e istamina) e di inibire le funzioni (migrazione, attivazione, proliferazione) di tutte le cellule coinvolte nella

reazione infiammatoria e/o immunitaria. Uno spettro d'azione così ampio rende ragione di come i GC siano i farmaci anti-infiammatori più efficaci al momento disponibili e risultino attivi praticamente in tutti i tipi di flogosi, mostrando così particolare utilità soprattutto quando la responsabilità di una condizione infiammatoria ricade in ugual misura su più autacoidi o quando il mediatore principalmente responsabile del processo patologico non è noto.

Nel caso dei FANS invece, l'attività anti-infiammatoria deriva principalmente dalla loro capacità di inibire la sintesi dei prostanoidi: questi autacoidi, infatti, svolgono un ruolo chiave nella genesi della sintomatologia clinica di numerosi tipi di infiammazione, agendo soprattutto come amplificatori degli effetti di altri mediatori comunemente coinvolti nel processo flogistico (bradichinina, istamina, citochine, etc.). Si intuisce, comunque, che lo spettro dell'attività anti-infiammatoria dei FANS è meno ampio di quello dei GC e non comprende, per esempio, le flogosi di natura allergica.

Una considerazione, che va fatta con particolare riferimento alla medicina veterinaria, riguarda l'esistenza di profonde differenze specie-specifiche nei meccanismi fisiopatologici dell'infiammazione e della risposta immunitaria documentate da numerose evidenze cliniche e sperimentali (diversa sensibilità agli stimoli pro-infiammatori; variabilità del tipo e dell'intensità delle reazioni ad insulti di varia natura; diversa incidenza di specifiche patologie su base infiammatoria e/o immunologica, etc.). Ciò limita la trasferibilità dei dati relativi all'efficacia di un trattamento farmacologico da una specie all'altra e rende quanto mai necessaria la realizzazione di studi dedicati ad ogni singola specie animale di interesse [Zizzadoro e Belloli, 2009].

1.2.1 FANS

I Farmaci Anti-infiammatori Non Steroidei (FANS o NSAIDs – *Non Steroidal Anti-inflammatory Drugs*) sono largamente utilizzati in medicina umana e veterinaria per la loro riconosciuta efficacia nel produrre effetti anti-infiammatori, analgesici e antipiretici. A fronte dei benefici offerti, i FANS sono tuttavia responsabili, nell'uomo come negli animali domestici, di ben noti effetti collaterali indesiderati (gastropatie, nefropatie, turbe dell'emostasi, etc.), talvolta anche gravi, che costituiscono un importante limite al loro potenziale terapeutico. Pertanto, l'identificazione del FANS "ideale" (efficace e sicuro al tempo stesso), ha da sempre rappresentato uno dei principali obbiettivi della ricerca farmacologica in questo campo.

La storia di questi farmaci vede le sue origini nell'antichità: risalgono infatti ai tempi degli antichi Egizi (3000 a.C.) e, successivamente, di Ippocrate (400 a.C.), le prime segnalazioni circa l'uso di preparazioni officinali a base di corteccia e foglie di salice come rimedio per ridurre la febbre ed alleviare dolori di diversa natura. Nel 1829, Leroux identificò il principio attivo responsabile delle proprietà terapeutiche del salice in un glucoside, la salicina, dalla cui idrolisi ottenne l'alcol salicilico (o saligenina). Attraverso successive manipolazioni chimiche, nel 1838 fu sintetizzato l'acido salicilico, un composto però così irritante da poter essere impiegato solo per uso esterno, come cheratolitico: il suo sale sodico, il salicilato di sodio, meno irritante e pertanto idoneo all'uso sistemico, rappresenta il primo FANS di sintesi introdotto per l'uso clinico (1875). In seguito, nell'intento di ottenere un farmaco con palatabilità e tollerabilità migliori rispetto al salicilato, il chimico tedesco Hoffmann, della Bayer Pharmaceutical Company, sintetizzò nel 1899 un derivato acetilato dell'acido salicilico, l'acido acetil salicilico, meglio noto con il nome commerciale di Aspirina®, e considerato il

progenitore dei FANS moderni. Da allora, numerosi altri composti, come i derivati pirazolonici, l'indometacina, i derivati oxicamici, sono stati sintetizzati ed introdotti nella pratica clinica nel tentativo di produrre un farmaco più efficace e sicuro dell'aspirina; nessuno di essi, tuttavia, ha mai offerto particolari vantaggi rispetto a questa, almeno in termini di tollerabilità. Solo nel 1971, venne descritto per la prima volta il meccanismo d'azione e quindi l'inibizione della produzione delle PG, a loro volta derivati dell'AA, attraverso l'inibizione delle COX [Vane, 1971]. Ulteriori progressi significativi, sono stati compiuti, soprattutto nell'arco degli ultimi quindici anni, grazie alle nuove conoscenze acquisite in merito alla biologia degli enzimi cicloossigenasi, principali bersagli dell'azione dei FANS, ed alla fisiopatologia del processo infiammatorio. Sono nati così nuovi gruppi di FANS cosiddetti "innovativi" (inibitori selettivi della COX-2, inibitori duplici, nitro-FANS), che, rispetto ai FANS "tradizionali" (farmaci aspirino-simili), sembrano offrire potenziali vantaggi in termini di efficacia e tollerabilità (soprattutto gastrica), anche se nessuno di essi può considerarsi il farmaco ideale per il controllo dell'infiammazione, del dolore e della febbre. I FANS "innovativi" non possono pertanto sostituirsi totalmente ai FANS "tradizionali", ma la loro introduzione ha ampliato le possibilità di scelta del farmaco più adatto per ciascun tipo di paziente e di patologia.

I FANS sono indicati sia per il trattamento del dolore cronico, sia per quello acuto. Nell'ambito di quest'ultimo possono essere usati singolarmente per il dolore lieve-moderato, oppure in un regime di analgesia "multimodale", combinati con gli oppioidi per il dolore da moderato a severo. Tale combinazione è di grande beneficio perché permette la riduzione del dosaggio degli oppioidi, riducendo i numerosi effetti

collaterali a loro associati come la nausea, il vomito, le vertigini, la confusione, la sonnolenza, la ritenzione urinaria, il prurito e la costipazione [Langford e Metha, 2006].

Le numerose molecole appartenenti a questa classe di farmaci (**Tab. 1**), vengono classificate sulla base della loro struttura chimica, in base alla selettività per le COX-1 e COX-2 e quindi in base al meccanismo d'azione e in base all'effetto farmacologico. Come già visto, tutti i FANS condividono un meccanismo d'azione comune che consiste nell'inibizione delle COX, con conseguente riduzione dei prostanoidi e degli effetti da questi mediati. Il parametro che varia tra un FANS e l'altro (e quindi gli attribuisce effetti farmacologici diversi) è invece la selettività per le diverse COX. Utilizzando idonei saggi farmacologici *in vitro*, è possibile studiare separatamente la potenza inibitoria dei vari FANS per la COX-1 e la COX-2. Il rapporto tra IC_{50} (concentrazione di farmaco che inibisce del 50% l'attività dell'enzima) per la COX-1 e per la COX-2, determinati per la stessa molecola (cosiddetto rapporto COX-1/COX-2), è assunto, per convenzione, quale indice della selettività del farmaco per le due diverse isoforme di COX. In base al valore del rapporto COX-1/COX-2, i FANS sono così definiti e classificati:

- inibitori non selettivi delle COX (rapporto = 1), se risultano equi-potenti verso le COX-1 e COX-2 ($IC_{50} \text{ COX-1} = IC_{50} \text{ COX-2}$).
- Inibitori preferenziali della COX-1 o inibitori selettivi della COX-1 (rapporto <1 o $<<1$, rispettivamente), se sono inibitori più potenti della COX-1 che della COX-2 ($IC_{50} \text{ COX-1} < o << IC_{50} \text{ COX-2}$).
- Inibitori preferenziali della COX-2 o inibitori selettivi della COX-2 (rapporto >1 o $>>1$, rispettivamente), se sono inibitori più potenti della COX-2 che della COX-1 ($IC_{50} \text{ COX-1} > o >> IC_{50} \text{ COX-2}$) [Zizzadoro e Belloli, 2009].

<u>GRUPPI CHIMICI</u>	<u>COMPOSTI RAPPRESENTATIVI</u>
<u>ACIDI CARBOSSILICI</u>	
Derivati dell'acido salicilico (salicilati)	<u>acido acetilsalicilico</u> (aspirina), salicilato di sodio
Derivati dell'acido propionico	naprossene, carprofene, ketoprofene
Acidi antranilici	acido tolfenamico
Derivati dell'acido acetico	ellena, etodolac
Acidi amino nicotinici	flunixin meglumina
Acidi chinolinici	cincofene
<u>ACIDI ENOLICI</u>	
Pirazolonici	<u>fenilbutazone</u> , dipirone
Oxicami	piroxicam, dipirone
<u>ALTRI</u>	
Derivati del paraminofenolo	<u>Paracetamolo</u> , fenacetina
Sulfonanilidi	nimesulide
Alcanoni	nabumetone (pro farmaco)

Tab.1 – Classificazione chimica dei più comuni FANS tradizionali [Zizzadoro e Belloli, 2009]

1.2.2 FANS tradizionali (t-FANS)

Il meccanismo d'azione dei FANS sulle COX può essere suddiviso in 3 classi:

1. Meccanismo competitivo semplice (inibitori reversibili; ibuprofene, piroxicam, naprossene, sulindac e nabumetone). La maggior parte dei t-FANS inibisce le COX in

maniera reversibile, mediante competizione con l'AA per il legame a comuni siti di ancoraggio all'interno del canale cicloossigenasico. Così, per esempio, il residuo polare di arginina presente sulle COX in posizione 120 (Arg-120), rappresenta un importante sito di ancoraggio per il gruppo -COOH dell'AA ed è un comune sito di legame anche per tutti i t-FANS appartenenti al gruppo degli acidi carbossilici **(Fig.6a)**;

2. Meccanismo competitivo tempo-dipendente (inibitori lentamente reversibili; indometacina, flurbiprofene, diclofenac, celecoxib, rofecoxib);
3. Meccanismo competitivo irreversibile (inibitori irreversibili: acido acetilsalicilico).

L'acido acetilsalicilico è l'unico t-FANS finora conosciuto in grado di inibire in maniera irreversibile le COX mediante *trans*-acetilazione selettiva di uno specifico residuo di serina (Ser-530) che occupa una posizione strategica nel canale cicloossigenasico. La serina così acetilata crea un ingombro sterico che impedisce all'AA di interagire con il residuo tirosinico in posizione 385 (Tyr-385), evento, questo, indispensabile per dare inizio alla catalisi enzimatica **(Fig.6b)**. Poiché il radicale acetilico ($\text{CH}_3\text{-CO-}$) donato dall'aspirina instaura con il residuo di serina un legame di tipo covalente, l'inibizione delle COX da parte di questo t-FANS, oltre che non competitiva, è anche irreversibile. Dal punto di vista applicativo, ne consegue che la durata degli effetti inibitori dell'aspirina sarà condizionata non tanto dalle caratteristiche cinetiche della molecola, quanto dalla capacità dei diversi bersagli cellulari di sintetizzare COX *de novo* [Zizzadoro e Belloli, 2009].

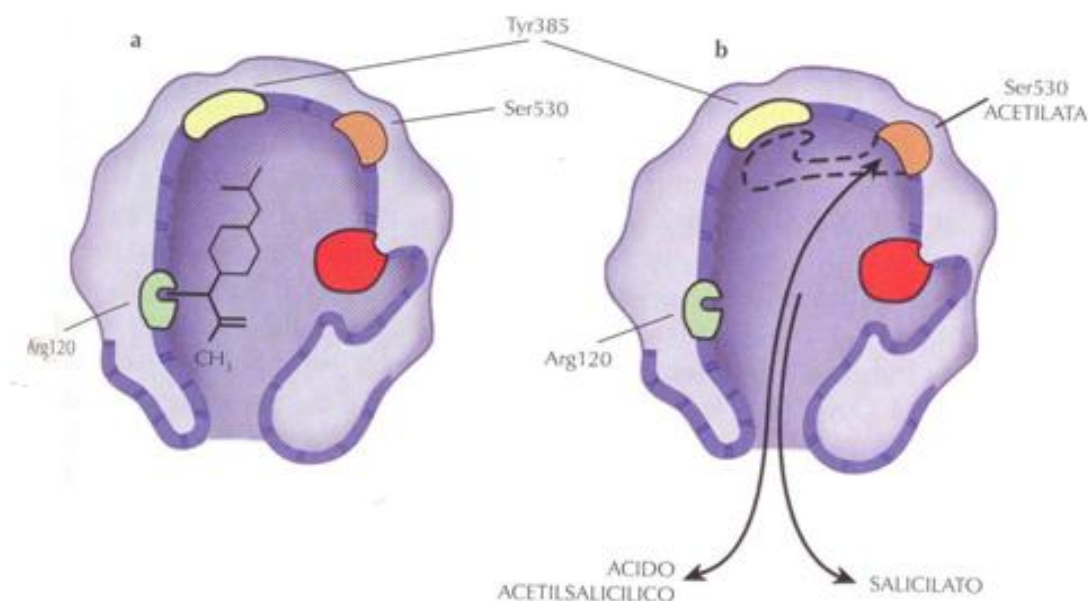


Fig.6 a/b - Meccanismi molecolari dell'inibizione delle cicloossigenasi da parte dei t-FANS. **a)** inibizione competitiva reversibile: legame reversibile all'Arg-120 e competizione con l'AA per l'ancoraggio a questo sito; **b)** inibizione non competitiva irreversibile: la Ser-530, acetilata dall'aspirina, crea un ingombro sterico che impedisce all'AA di raggiungere il sito Tyr385, essenziale per la sua successiva ciclo ossigenazione [Zizzadoro e Belloli, 2009].

Gli **effetti farmacologici** dei t-FANS sono essenzialmente tre: anti-infiammatori, analgesici e anti-piretici. La potenza con cui ogni singolo composto produce questi effetti farmacologici può essere significativamente differente e le dosi necessarie per produrre l'effetto antipiretico e analgesico sono in genere inferiori a quelle necessarie per ottenere l'effetto anti-infiammatorio. Inoltre, non tutti i composti sono in grado di evocare i tre suddetti effetti farmacologici con uguale efficacia. Ad esempio l'aspirina, spesso considerata la molecola di riferimento di questa classe, e la flunixinina, esercitano le tre azioni in maniera abbastanza bilanciata. Il fenilbutazone, uno dei primi t-FANS introdotti in medicina veterinaria applicata sul cane, è efficace come anti-infiammatorio ed analgesico, ma pressoché privo di attività antipiretica. Le ragioni di un comportamento farmacologico così diversificato tra i singoli farmaci, sono da ricercare nelle differenze del profilo dinamico (e anche cinetico), e nelle caratteristiche

biologiche delle loro COX bersaglio [Zizzadoro e Belloli, 2009]. Di seguito sono riportate le caratteristiche principali comuni ai t-FANS:

Effetto anti-infiammatorio: conseguenza dell'inibizione della sintesi di prostanoidei prodotti e liberati nei tessuti dalle cellule residenti e dalle cellule infiammatorie ivi migrate in risposta ad un insulto di varia natura. L'efficacia anti-infiammatoria del t-FANS dipende dalla sede anatomica e/o dalla causa scatenante il processo infiammatorio. Questa classe di farmaci risulta particolarmente efficace nel controllo della flogosi acuta o della riacutizzazione di processi infiammatori cronicizzati, nel corso delle quali i prostanoidei forniscono un contributo rilevante alla patogenesi di tutte le classiche manifestazioni cliniche (*rubor, calor, tumor, dolor e functio laesa*). Meno efficaci invece, nelle flogosi croniche, in cui l'infiammazione è sostenuta dalla compartecipazione di una serie articolata di mediatori, dove i prostanoidei rivestono un ruolo secondario. Ne consegue un contributo significativo solo per singoli aspetti della malattia infiammatoria (es. dolore). Sono in genere privi di efficacia nel controllo delle flogosi di natura allergica, nel corso delle quali, infatti, altri mediatori con attività simili svolgono probabilmente un ruolo patogenetico di importanza pari o superiore a quello dei prostanoidei.

Effetto analgesico: dovuto all'inibizione della sintesi di prostanoidei che hanno un ruolo importante nella genesi del dolore nei tessuti periferici e nella trasmissione dell'informazione dolorifica nel SNC.

Effetto anti-piretico: dovuto all'inibizione della sintesi COX-2 dipendente di prostaglandine nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni ipotalamici in risposta a pirogeni esogeni ed endogeni. I t-FANS abbassano la temperatura corporea solo in caso di febbre da pirogeni mentre non influenzano la normale temperatura corporea

(non esercitano un effetto ipotermizzante), né riducono l'iperpiressia prodotta da stimoli di altra natura (esercizio fisico, temperatura ambientale elevata, intossicazioni, etc.).

Vanno considerati altresì altri due importanti effetti più recentemente evidenziati:

Effetto anti-aggregante: dovuto all'inibizione della sintesi COX-1 mediata di prostanoidi di origine piastrinica (TXA₂). I t-FANS vengono per questo utilizzati nella gestione di molte malattie ischemiche e/o trombo-emboliche che colpiscono l'uomo (malattie coronariche, cerebrovascolari, etc.) e gli animali domestici (filariosi cardiopolmonare del cane, miocardiopatie dei felini, laminite equina, etc.), riconducibili ad un' inappropriata attivazione del processo di aggregazione piastrinica. La molecola più efficace è l'aspirina, che è l'unico t-FANS che inibisce le COX in maniera irreversibile. Poiché le piastrine mature, prive di nucleo, sono incapaci di sintetizzare nuove COX dopo che quella già espressa è stata acetilata dall'aspirina, la durata del blocco farmacologico è pari alla vita media della piastrina nel torrente circolatorio (9-10 giorni). Ciò prevede che il farmaco sia somministrato a basse dosi (di gran lunga inferiori a quelle necessarie per ottenere l'effetto anti-infiammatorio, analgesico anti-piretico) e in maniera continuativa, permettendo di promuovere un'azione selettiva sulla COX piastrinica (COX-1), senza significativa alterazione dell'attività cicloossigenasica di altre cellule o tessuti.

Effetto anti-tumorale: i t-FANS inibiscono l'effetto facilitatore dei prostanoidi sulla crescita tumorale. Il loro ruolo come potenziali farmaci anti-tumoral si sta sempre più consolidando, con la concomitante partecipazione di COX-1 e COX-2.

Effetti collaterali.

Alle comuni dosi usate in terapia, i t-FANS determinano una generalizzata e pressoché totale inibizione dell'attività delle COX. Il loro utilizzo, pertanto, comporta la riduzione della biosintesi non solo dei prostanoidi che mediano infiammazione, dolore e febbre, ma anche di quelli implicati, generalmente con funzione omeostatica o compensatoria, nella regolazione di altri processi biologici (citoprotezione gastrica, funzione renale, funzione piastrinica, etc.). Di conseguenza, questi farmaci sono spesso responsabili dell'insorgenza di importanti e ben noti effetti collaterali, per lo più indesiderati, che si manifestano principalmente a carico del tratto gastrointestinale, del rene e delle piastrine e che, in alcuni casi, possono evolvere in vere e proprie manifestazioni di tossicità, mettendo a repentaglio la vita del paziente. Poiché in soggetti particolarmente sensibili gli effetti collaterali indesiderati e/o tossici dei t-FANS possono manifestarsi, anche alle dosi terapeutiche, questi farmaci devono essere considerati a basso indice terapeutico. Accanto ai classici effetti collaterali che caratterizzano e limitano l'uso dei t-FANS, sono state descritte altre reazioni avverse a questi farmaci che possono presentarsi con incidenza e gravità variabili e che non necessariamente sono legate all'inibizione delle COX: reazioni cutanee, danni alle cartilagini articolari, rallentamento dei processi di guarigione delle fratture, asma da aspirina [Zizzadoro e Belloli, 2009]. Sebbene non siano stati confermati effetti teratogeni, studi su roditori hanno dimostrato anche la crescita della mortalità neonatale e un aumento degli aborti [Chaveze e DeKorte, 2003].

Farmacocinetica.

Il comportamento cinetico dei t-FANS mostra degli aspetti grosso modo comuni a tutte le molecole, con alcune peculiarità, tuttavia, legate a singoli composti o, più spesso, specie-specifiche.

Assorbimento: per la maggior parte dei composti sono disponibili in commercio formulazioni per uso orale e per uso parentale (IM, SC, IV). Negli animali poligastrici ed erbivori monogastrici, la somministrazione orale dei t-FANS è in genere sconsigliata a causa del lento ed irregolare assorbimento; essa è invece la via più utilizzata nei carnivori domestici, soprattutto in caso di terapie protratte. In questi animali l'assorbimento orale è generalmente rapido e completo (biodisponibilità orale dell'80% in media) ed è favorito dalla combinazione di tre fattori: il pKa e la liposolubilità del farmaco ed il pH dell'ambiente gastrico. I t-FANS sono per la maggior parte elettroliti deboli a reazione acida ed hanno valori di pKa compresi tra 3 e 6. In un ambiente acido, quale è quello dello stomaco dei monogastrici ($\text{pH} < 3$), questi farmaci predominano nella forma indissociata liposolubile, che consente loro un rapido superamento delle membrane delle cellule epiteliali che rivestono la mucosa gastrica. Nella cellula, il pH neutro o debolmente alcalino (7,0-7,4) favorisce la dissociazione del farmaco che, trovandosi in forma ionizzata meno liposolubile, abbandona lentamente la cellula per raggiungere il torrente circolatorio. Si verifica così un progressivo accumulo intracellulare (cosiddetto intrappolamento ionico) e conseguente inibizione completa dell'attività cicloossigenasica di queste cellule. Un tale comportamento cinetico, spiega la peculiare azione lesiva che i t-FANS esercitano a carico dello stomaco e della porzione prossimale del duodeno e, inoltre, giustifica alcune misure comunemente adottate nel tentativo di ridurre la gastrolesività di questi farmaci (es.

somministrazione a stomaco pieno, che favorisce la diluizione del principio attivo nel contenuto gastrico).

Distribuzione: nel torrente circolatorio i t-FANS generalmente risultano in massima parte (>95%) legati alle proteine plasmatiche (albumine). Un legame siero-proteico così elevato si traduce in un limitato volume di distribuzione. Tuttavia non costituisce un limite ai fini del raggiungimento di concentrazioni efficaci nel sito d'azione, dal momento che, in un tessuto infiammato, l'aumentata permeabilità vasale permette alle proteine plasmatiche di passare nei liquidi interstiziali e il pH debolmente acido favorisce la predominanza del farmaco nella forma indissociata (liposolubile) e, quindi, la sua penetrazione nelle cellule presenti nel focolaio flogistico. Altra importante conseguenza del legame siero-proteico è rappresentata dalle possibili interazioni con altri farmaci legati anch'essi alle proteine plasmatiche (es. chinoloni). Tutti i t-FANS, fatte solo poche eccezioni, attraversano liberamente la placenta, mentre la penetrazione della barriera ematoencefalica è condizionata dalle caratteristiche chimico-fisiche della molecola. Il paracetamolo e il dipirone, farmaci non acidi e con scarso legame alle siero proteine, sono i composti che mostrano migliore capacità di penetrazione nel SNC.

Metabolismo: la quantità totale di farmaco assorbita viene eliminata dall'organismo in massima parte attraverso processi di metabolismo che si svolgono principalmente in sede epatica. I t-FANS possono andare incontro a reazioni di fase 1 (processi di ossidazione, riduzione, idrolisi, etc.) e/o a reazioni di fase 2 (coniugazione) e la predominanza delle diverse vie metaboliche dipende dal singolo composto e dalla specie animale. Le reazioni di fase 1 portano in genere alla formazione di metaboliti inattivi, ma in alcuni casi, possono avere (a) un'attività farmacologica pari o inferiore a

quella della molecola madre contribuendo all'efficacia terapeutica, oppure (b) un'attività tossica. Nel caso di alcuni composti, il metabolismo di fase 1 è indispensabile per poter osservare l'effetto terapeutico, in quanto l'attività farmacologica risiede unicamente nei metaboliti (pro-farmaci). Le reazioni di fase 2, nella maggior parte dei casi, constano di reazioni di coniugazione con acido glucuronico (glucuronoconiugazione) catalizzate dall'enzima glucuronil-transferasi e interessano in maggior misura i composti fenolici, come l'aspirina ed il paracetamolo. Il metabolismo dei t-FANS procede poi, attraverso la via delle famiglie dei citocromi CYP3A e CYP2C appartenenti al sistema enzimatico dei citocromi P450 [Katzug et al. 2009].

Escrezione: la principale via di escrezione dei t-FANS e dei loro metaboliti, è rappresentata dal rene e il passaggio nelle urine è conseguente a processi di trasporto tubulare attivo o di filtrazione glomerulare. La particolare acidità delle urine dei carnivori domestici, soprattutto del gatto, favorisce il riassorbimento tubulare di composti sufficientemente liposolubili, rendendo la loro eliminazione più lenta rispetto a quanto si verifica negli erbivori (urine alcaline). Nel cane, i glucuronidi derivanti da composti come, naproxene, ibuprofene e indometacina, vengono in massima parte eliminati per via biliare e subiscono un importante ricircolo enteroepatico, che rende ragione della più lunga emivita che tali t-FANS hanno in questa specie animale rispetto ad altre (es. l'emivita del naproxene è di circa 4h nel cavallo, 14h nell'uomo e 35h nel cane). Una conseguenza di tale fenomeno è rappresentata da un prolungamento dell'esposizione della mucosa enterica al farmaco, la cui azione lesiva viene ad essere esaltata [Lees et al., 2004].

Tossicità.

Gli effetti tossici si manifestano per motivazioni differenti, quali, il sovradosaggio o l'inadeguatezza dei meccanismi cinetici di eliminazione, causando concentrazioni tissutali elevate. Il gatto, dotato di scarsa capacità glucuronil-transferasica, è la specie in cui queste manifestazioni tossiche si presentano con maggiore frequenza e gravità.

Usi clinici.

I t-FANS trovano applicazione per il trattamento sintomatico di gran parte delle condizioni morbose, in cui, simultaneamente o separatamente, si manifestano una reazione infiammatoria acuta, un dolore acuto o cronico, un processo febbrile. Un ulteriore campo di applicazione dei t-FANS deriva dalla riconosciuta attività antiendotossica di alcuni composti (flunixin), con manifestazioni cliniche mediate, almeno in parte, dalla produzione di prostanoidei, della cui sintesi l'endotossina batterica è uno stimolo particolarmente potente. In tempi relativamente recenti, infine, si è presa in considerazione la possibilità di estendere l'uso dei t-FANS anche al campo della oncologia e della neurologia. Numerosi dati epidemiologici e clinici, suggeriscono che i t-FANS potrebbero essere utili per la prevenzione e/o il trattamento di alcune malattie tumorali e di particolari malattie neurodegenerative, come il morbo di Alzheimer [Bonavita et al., 2000].

1.2.3 I COXIBs

I farmaci inibitori selettivi della COX-2 sono chimicamente affini ed appartengono alla classe chimica dei cosiddetti *coxib*. Questa denominazione sta ad indicare una specifica classe chimica di composti caratterizzati da una peculiare struttura molecolare

(contenente un anello triciclico ed un gruppo metilsulfonico o solfonamidico). Capostipiti degli inibitori selettivi della COX-2 sono il **celecoxib** ed il **rofecoxib**. Numerose altre molecole si sono in seguito aggiunte (inibitori selettivi della COX-2 di seconda generazione, come l'**etoricoxib**, il **valdecoxib** e il suo pro farmaco **parecoxib**) che si distinguono per una sempre più elevata selettività verso la COX-2, caratteristiche farmacocinetiche più favorevoli e/o minori effetti collaterali. Specificatamente create per l'uso in medicina veterinaria (cane) sono il **deracoxib** ed il **firocoxib**, dotato quest'ultimo di maggiore selettività rispetto al primo a parità di test sperimentale e di specie animale. Questa nuova classe di FANS è stata creata con l'obiettivo di inibire profondamente l'attività della COX-2 ripristinando quella della COX-1 nell'animale trattato con dosi terapeutiche. Questi FANS, infatti, risultano da 50 a oltre 100 volte più potenti nell'inibire l'attività della COX-2 rispetto a quella della COX-1 e, ai dosaggi terapeutici, inibiscono *in vivo* per oltre il 70% l'attività della COX-2, senza influenzare in modo significativo quella della COX-1. Studi clinici hanno dimostrato che i farmaci COX-2 selettivi provocano una riduzione importante del dolore e del gonfiore delle articolazioni, con una bassa incidenza statisticamente significativa di ulcere gastriche [Simon et al., 1998; Isakson et al., 1998]. Le basi molecolari della selettività per la COX-2 risiedono (**Fig.7**):

- a. nella presenza dei gruppi funzionali metilsulfonico (SO_2Me) e solfonamidico (SO_2NH_2), capaci di interagire con i residui aminoacidici localizzati in corrispondenza della tasca laterale del canale cicloossigenasico (accessibile solo alla COX-2);

- b. nell'assenza del gruppo carbossilico ($-\text{COOH}$), che impedisce alla molecola di avere un sito di ancoraggio sull'Arg-120, riducendo sensibilmente la capacità di legame della molecola alla COX-1;
- c. nell'ingombro sterico, che rende difficoltoso l'ingresso della molecola nello stretto canale cicloossigenasico della COX-1.

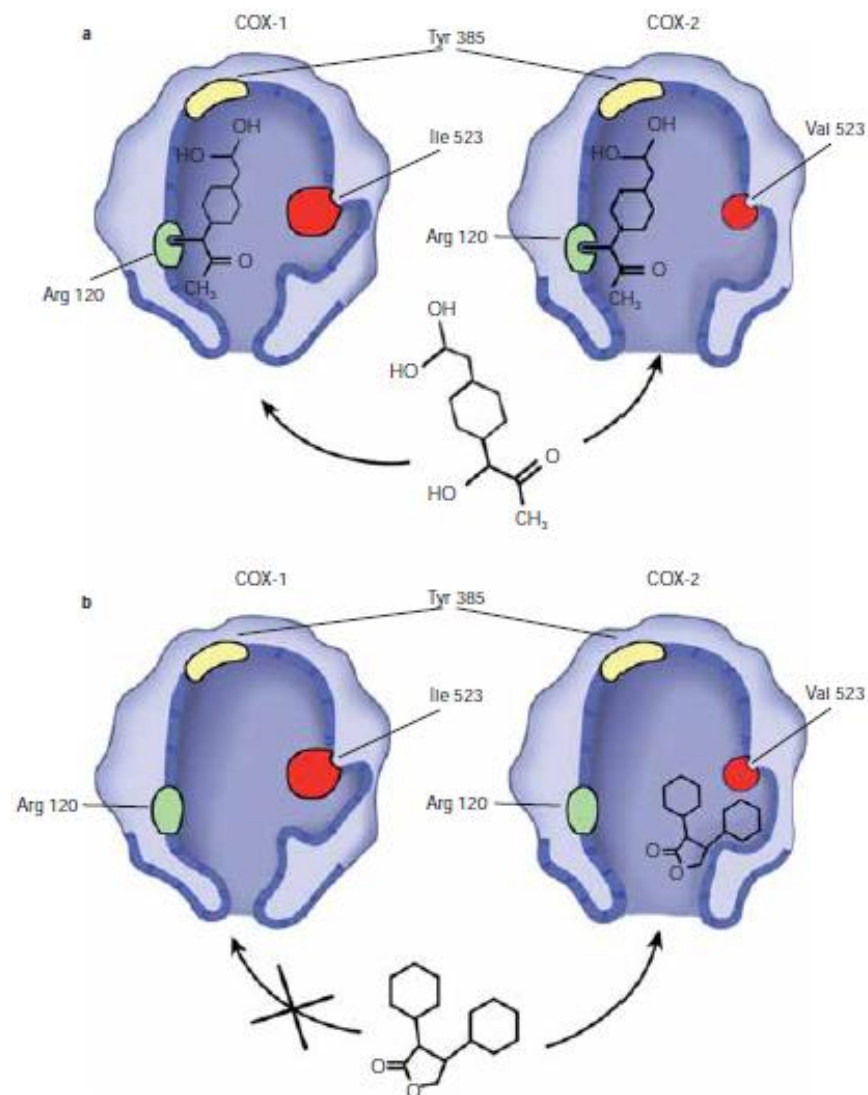


Fig.7 – Basi molecolari della selettività dei FANS inibitori della COX-2. a) I FANS inibitori non selettivi della COX-2 (t-FANS) hanno accesso al canale cicloossigenasico di entrambe le isoforme dove possono legarsi al residuo Arg120; b) i FANS selettivi della COX-2 legano i residui aminoacidici presenti nella tasca laterale mediante i loro gruppi funzionali metilsulfonico o sulfonamidico, non legano l'Arg120 per assenza del gruppo $-\text{COOH}$, non hanno accesso alla tasca laterale della COX-1 ostruita dal voluminoso residuo aminoacidico Ile523 e sono caratterizzati da un ingombro sterico che ostacola il loro ingresso nel canale cicloossigenasico della COX-1, più stretto di quello della COX-2 [Zizzadoro e Belloli, 2009].

1.2.3.1 Effetti farmacologici, Effetti collaterali ed Usi clinici

I primi studi clinici condotti su pazienti umani malati hanno effettivamente confermato le aspettative poste in questa nuova classe di FANS, dimostrando per *celecoxib* e *rofecoxib* un'efficacia anti-infiammatoria, antipiretica ed analgesica paragonabile a quella dei t-FANS e, sempre rispetto a questi, una maggiore tollerabilità gastroenterica (minore rischio di ulcere associato al loro impiego). Gli inibitori selettivi della COX-2, inoltre, sono risultati totalmente privi di effetti antiaggreganti, essendo la produzione piastrinica di TXA₂ esclusivamente dipendente dall'attività della COX-1. Tutto ciò ha portato all'immissione in commercio di queste molecole ed al loro utilizzo su vasta scala per il trattamento di malattie osteoarticolari (osteoartrite e artrite reumatoide), principale campo di applicazione di tali farmaci. Tuttavia, parallelamente al crescente numero di evidenze sperimentali indicative di ruoli pro-patologici per i prostanoidei sintetizzati via COX-2, anche l'uso clinico di questi FANS è risultato associato ad importanti limiti, sia in termini di efficacia che di tollerabilità, producendo sotto quest'ultimo aspetto effetti avversi in parte simili a quelli dei FANS-tradizionali e in parte del tutto nuovi. Infatti, l'efficacia degli inibitori selettivi della COX-2 come analgesici ed anti-infiammatori risulta in alcuni casi inferiore a quello dei t-FANS, probabilmente a causa di un coinvolgimento di prostanoidei sintetizzati per intervento di altre COX (COX-1 e COX-3) sia a livello periferico che a livello centrale. Gli inibitori selettivi della COX-2, inoltre, mostrano un profilo di tollerabilità gastroenterica realmente superiore rispetto a quello dei t-FANS solo in soggetti privi di patologie gastroenteriche di base; quando usati, in pazienti con preesistenti lesioni gastroenteriche (gastrite, ulcere, etc.), gli inibitori selettivi della COX-2 possono interferire con i processi riparativi e/o compensatori attivati localmente (mediati da

prostanoidi sintetizzati via COX-2), aggravando la patologia di base o, quanto meno, ritardandone la guarigione. Anche rispetto all'interferenza con la funzionalità renale, gli inibitori selettivi della COX-2 non offrono alcun vantaggio rispetto ai t-FANS, essendo la COX-2 l'isoforma maggiormente coinvolta nella regolazione prostanoide-dipendente del flusso emodistrettuale renale.

Come già detto, gli inibitori selettivi della COX-2 sono sicuramente privi degli effetti anti-aggreganti dei t-FANS, ma sono anche potenzialmente capaci di ridurre la produzione di prostanoide vasodilatatori di origine endoteliale (PGI₂): ciò giustifica l'esistenza di esplicite controindicazioni all'uso di questi farmaci in soggetti a rischio di malattie ischemiche o tromboemboliche e spiega il ritiro dal commercio del rofecoxib (ottobre 2004), il cui uso infatti è risultato associato ad una maggiore frequenza di incidenti cardiovascolari di tipo ischemico. Va infine ricordato che, in relazione al ruolo che i prostanoide sintetizzati via COX-2 hanno nella fisiologia della riproduzione femminile e nello sviluppo fetale, l'uso di questi farmaci potrebbe ridurre la fertilità di femmine in età riproduttiva e, in maniera simile ai t-FANS, essere controindicato in gravidanza (ritardo del parto, chiusura prematura del dotto arterioso, potenziale teratogenesi, etc.). È possibile che l'uso terapeutico degli inibitori selettivi della COX-2 possa godere di successi futuri nel trattamento di altri stati patologici non strettamente correlati all'infiammazione. Considerata infatti l'implicazione funzionale dei prostanoide sintetizzati via COX-2 nella proliferazione e nell'invasività di alcuni tipi di tumori dell'uomo e del cane, questi farmaci potrebbero trovare indicazione come anti-neoplastici (nell'uomo, l'uso del celecoxib è approvato per il trattamento della poliposi adenomatosa familiare) [Rao et al., 2005].

1.2.4 COXIBs di prima generazione

1.2.4.1 CELECOXIB (celebrax®)

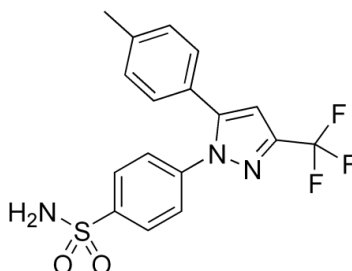


Fig.8 - Celecoxib (Celebrax®)

Il celecoxib, 4-[5-(4-Metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1-il] (**Fig.8**), è un inibitore selettivo per le COX-2 avente proprietà antinfiammatoria e analgesica, commercializzato dalla Pfizer con il nome commerciale Celebrax® e usato in medicina umana. È efficace nel trattamento di patologie infiammatorie croniche quali osteoartrite, artrite reumatoide e spondilite anchilosante [Rao et al., 2005]. Il celecoxib è considerato uno dei primi FANS a bassa tossicità GI, selettivo per la COX-2. Ha una moderata affinità per la COX-2 secondo la tradizionale classificazione in base alla selettività *in vitro* (COX-1/COX-2 IC₅₀) con un valore di 30 [Tacconelli et al., 2002]. La sua struttura chimica è caratterizzata dalla presenza di una porzione sulfonammidica ed è scarsamente solubile in acqua, quindi non può essere somministrato per via IV. Viene somministrato per via orale ed ha una biodisponibilità molto bassa (20-40%). A differenza degli altri COXIB che si distribuiscono in maniera uniforme in tutto il corpo, il celecoxib è estremamente lipofilo e tende ad accumularsi nel tessuto adiposo. Se assunto con cibi ricchi di grasso la C_{max} plasmatica si ritarda di 1-2 h [Shi e Klotz, 2007]. Questo farmaco è metabolizzato soprattutto dall'isoforma 2C9 del citocromo P450 e i suoi principali metaboliti sono escreti tramite le urine e le feci come coniugati glucuronici (circa il 73% della dose). Meno del 3% della dose assunta è escreta

immodificata. Uno degli ultimi studi ha mostrato che il celecoxib può ridurre la formazione di polipi in pazienti con poliposi familiare, mantenendo un buon profilo di sicurezza in modelli preclinici con rispettivamente $t_{1/2}$ e t_{max} di 2 e 12 h [Rao et al., 2005].

1.2.4.2 ROFECOXIB (Vioxx®)

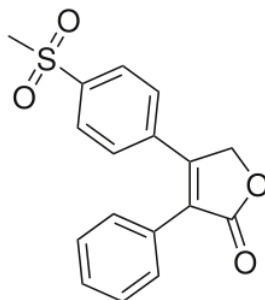


Fig.9 - Rofecoxib (Vioxx®)

Il rofecoxib, 4[4-(methyl sulphonyl)phenyl]furan-2(5H) (**Fig.9**), è un FANS che è stato sviluppato dalla Merck & CO. per il trattamento dell'artrite reumatoide, del dolore acuto e della dismenorrea, e commercializzato, dopo l'autorizzazione della FDA americana del 20 maggio 1999, con il nome commerciale Vioxx®, sotto forma di compresse e sospensione orale per uso umano. Il 30 settembre 2004, Merck lo ritirò volontariamente dal mercato a causa del possibile aumento del rischio di infarto del miocardio e ictus associato con un suo uso a lungo termine e ad alto dosaggio. Ha un'alta selettività tempo dipendente per l'inibizione della COX-2 con la quale forma un legame molto forte, con un rapporto stechiometrico 1:1. Risulta anche un blando inibitore reversibile della COX-1 [Rao et al., 2005]. In seguito a somministrazione orale presenta un buon assorbimento GI con picchi plasmatici dopo 2-3 h dall'assunzione. Il 72% è escreto nelle urine di cui meno dell'1% è immodificato, mentre il 14% è escreto immodificato nelle feci. Nessuno dei metaboliti identificati presenta attività inibitoria

nei confronti delle COX. Nel trattamento del dolore, una dose singola di 50 mg di rofecoxib ha un'efficacia paragonabile a 550 mg di naprossene e a 400 mg di ibuprofene [Bombardier et al., 2000].

1.2.5 COXIBs di seconda generazione

COXIBs ad uso veterinario

Gli unici inibitori selettivi della COX-2, attualmente disponibili in medicina veterinaria sono: il firocoxib, il deracoxib, il mavacoxib, il robenacoxib e il cimicoxib.

1.2.5.1 Firocoxib (Previcox®)

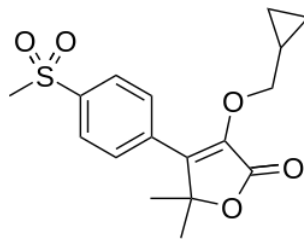


Fig.10 - Firocoxib (Previcox®)

Il firocoxib, 3-(cyclopropylmethoxy)-4-(4-methylsulfonyl)phenyl)5,5-dimethylfuranone) (**Fig.10**) è il primo COXIB ad essere stato approvato, nel 2004, dall'EMA per il trattamento del cane (uso orale), e, nel 2008, con estensione dell'utilizzo anche per il cavallo (sia orale che IV; nel 2006 è stato approvato anche dalla FDA come il primo COXIB indicato per il cavallo (uso orale). È commercializzato dalla Merial Limited con i nomi commerciali di Previcox® e Equioxx®, rispettivamente per il cane ed il cavallo. I dosaggi indicati per questo farmaco sono specie dipendenti, con la dose raccomandata di 0,1 mg/Kg/die per il cavallo (per un massimo di 14 giorni) e di 5 mg/Kg/die per il cane. Il firocoxib, nella sua forma di impasto (cavallo) o compresse masticabili (cane), è usato per il controllo del dolore e dell'infiammazione associati a DJD (Degenerative

Joint Disease) [Kvaternick et al., 2007]. Nel cane inoltre, è indicato anche per il controllo del dolore post chirurgico.

Nel 2010 Merial Limited ha annunciato l'introduzione negli USA di Equioxx® in soluzione iniettabile (IV) con la stessa indicazione terapeutica sopra descritta [Anonymous, 2010a; Anonymous, 2010b].

Da studi clinici il firocoxib è risultato altamente efficace ed accettabile per il controllo del dolore e dell'infiammazione associati a osteoartriti nei cani [Hanson et al., 2006]. Cani con una sinovite sperimentale indotta, trattati con firocoxib hanno mostrato una zoppia significativamente ridotta rispetto agli stessi, trattati con carprofene [McCann et al., 2004].

Alla somministrazione orale della dose raccomandata, il firocoxib mostra le seguenti caratteristiche farmacocinetiche (**Tab.2**) [Anonymous, 2006; Anonymous, 2007]:

	CANE	CAVALLO
Biodisponibilità assoluta	circa 38%	circa 79%
C _{max}	1,3 µg/mL	0,08 µg/mL
T _{max}	1 h	4 h
Legame con le PP	circa 96%	circa 98%
Tempo di emivita (t _½)	7,8 h	30-40 h

Tab. 2 –. Maggiori parametri farmacocinefici nel cane e nel cavallo dopo somministrazione di Firocoxib

Per quanto riguarda il metabolismo e l'eliminazione del firocoxib, il meccanismo metabolico principale è la deciclopropilmetilazione che da origine al metabolita desciclopropilmetilfirocoxib. Successivamente, si forma il suo glucuronide coniugato.

Entrambi i metaboliti hanno un'attività farmacologica bassa o nulla [Kvaternick et al., 2007]. L'eliminazione avviene principalmente per via urinaria e in misura minore attraverso le feci.

Analisi farmacodinamiche in condizioni di laboratorio controllate in uno studio su sei cani trattati con la dose terapeutica di firocoxib, non hanno rilevato nessun effetto avverso in termini di vomito, anoressia, letargia, debolezza, dolori addominali, ematochezia, profilo emocromocitometrico, ulcere [Steagall et al., 2007].

1.2.5.2 Deracoxib (Deramaxx®)

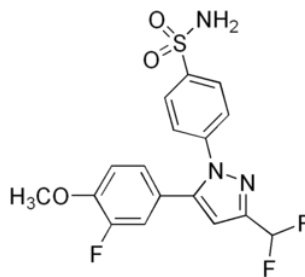


Fig.11 - Deracoxib (Deramaxx®)

Il deracoxib, 4-[5-(3-difluoro-4-methoxyphenyl)-(difluoromethyl)-1H-pyrazole-1-yl]benzenesulfonamide (**Fig.11**), è un inibitore selettivo facente parte dei COXIBs. È il primo COXIB approvato nel 2002 negli USA ed è indicato solo per i cani nel dolore ortopedico preoperativo e nel dolore cronico associato ad artrite [Davis et al., 2010]. È commercializzato da Novartis Animal Health, Inc. con il nome commerciale Deramaxx® ed è disponibile nella forma farmaceutica di compresse masticabili per uso orale.

Il deracoxib ha un assorbimento orale rapido. È legato alle proteine plasmatiche per più del 90%. A livello epatico, viene estesamente metabolizzato in 4 metaboliti principali. La quasi totalità del deracoxib è escreto attraverso le feci come molecola madre oppure come il metabolita O-demetilato [Anonymous, 2005c].

L'uso clinico del deracoxib nel cavallo non è stato ancora riportato, ma dati sperimentali suggeriscono che potrebbe essere un' alternativa ai tradizionali FANS con un minor rischio di effetti avversi a livello intestinale [Davis et al., 2010].

Il $t_{1/2}$ del deracoxib nel cane alla dose di 2-3 mg/Kg è di 3 h. Tale valore è minore rispetto a quello riportato per il gatto (7,9 h alla dose di 1 mg/Kg) e tanto minore ($12,49 \pm 1,84$ h alla dose di 2 mg/Kg) da quanto riportato da uno studio condotto su sei cavalli [Gassel et al., 2006].

1.2.5.3 Mavacoxib (Trocoxil®)

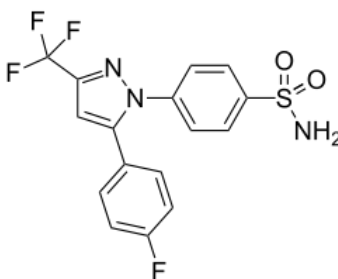


Fig.12 - Mavacoxib (Trocoxil®)

Il mavacoxib, 4-[5-(4-fluorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (**Fig.12**) è un inibitore selettivo delle COX-2 autorizzato dall'EMA (non è disponibile negli USA) nel 2008 e commercializzato da Pfizer Limited con il nome Trocoxil®. È disponibile solo per uso orale in compresse a dosaggio variabile (6, 20, 30, 75, e 95 mg), indicato per cani di età maggiore di 1 anno che soffrono di dolore e infiammazione associati a DJD e che necessitano di un trattamento continuo di oltre un mese.

Le caratteristiche farmacocinetiche di questo farmaco sono simili a quelle descritte per i due precedenti, con una differenza importante che riguarda la clearance e il $t_{1/2}$. La clearance è relativamente bassa (2,7 mL/h/Kg) e il $t_{1/2}$ è evidentemente prolungato con

un intervallo di 8-39 giorni (media circa 17 giorni) in cani giovani [Cox et al., 2010]. In cani di un'età media di 9 anni, il $t_{1/2}$ ha raggiunto un valore medio di 39 giorni e, in una piccola parte di questa popolazione (<5%), un valore di oltre l'80%; il motivo di questo fenomeno è tutt'oggi oscuro. Questo fattore permette la somministrazione di mavacoxib in un protocollo di una compressa al mese (nel primo mese, una ripetuta a distanza di 14 giorni dopo la dose iniziale) che rappresenta un vantaggio per quanto riguarda la collaborazione da parte dei proprietari. Somministrazione di mavacoxib che corrisponde al dosaggio mensile raccomandato fino ad un periodo di 6 mesi e mezzo ha prodotto un miglioramento della zoppia e delle qualità di vita dei cani studiati [Anonymous, 2011].

1.2.5.4 Robenacoxib (Onsior®)

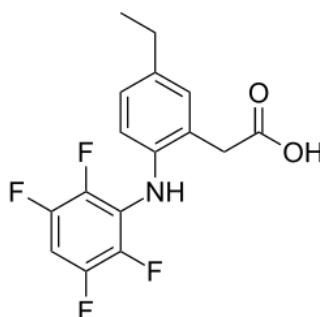


Fig.13 - Robenacoxib (Onsior®)

Il robenacoxib, 2-[5-ethyl-2-(2,3,5,6-tetrafluoroanilino)phenyl]acetic acid (**Fig.13**) è un nuovo farmaco, appartenente al gruppo COXIB, sviluppato esclusivamente per uso veterinario [King et al., 2009]. Il robenacoxib è stato autorizzato all'immissione in commercio in Europa nel Dicembre 2008 ed è commercializzato da Novartis Animal Health UK Ltd con il nome Onsior®, ed è indicato anche per il gatto. Negli USA è commercializzato già dal 2006 dalla Bayer Health Care LLC; nel Marzo 2011 è stato il primo COXIB approvato negli USA anche per il gatto. Le forme farmaceutiche sono

disponibili sia come compresse ad uso orale che come soluzione iniettabile. Le compresse sono indicate per il trattamento del dolore e dell'infiammazione associati a DJD cronica nei cani, e per il trattamento del dolore acuto e dell'infiammazione associati a disordini muscolo-scheletrici nei gatti. La soluzione iniettabile invece, è indicata per il trattamento del dolore e dell'infiammazione associati a chirurgia ortopedica (cane) o dei tessuti molli (cane e gatto); il trattamento per il dolore cronico è indicato per una durata di 6 settimane nel gatto e di 3 mesi nel cane [Anonymous, 2010c].

Strutturalmente, il robenacoxib è simile al diclofenac (Voltaren®, dal quale è stato derivato), un inibitore preferenziale della COX-2, e al lumiracoxib, l'inibitore più selettivo (*in vitro*) della COX-2 [Tacconelli et al., 2002]. La struttura del robenacoxib e del lumiracoxib differisce dagli altri inibitori selettivi per la COX-2 per il gruppo contenente l'acido carbossilico, invece che la porzione solforica presente negli altri [Esser et al., 2005].

Il profilo farmacocinetico del robenacoxib è stato sviluppato e largamente studiato da Jung et al. (2008) in cani ai quali è stato somministrato 1 mg/Kg di robenacoxib attraverso le vie IV, SC e orale (in cani sia nutriti che a digiuno). Il farmaco si è dimostrato ben tollerato in tutti gli animali e attraverso tutte le vie di somministrazione, e non si sono riscontrati effetti avversi. I risultati indicano un breve tempo per raggiungere la C_{max} e un'alta biodisponibilità dopo entrambe le vie, sottocutanea e orale a digiuno. La co-somministrazione di robenacoxib per via orale insieme al cibo riduce del 26% la biodisponibilità ma senza evidente alterazione della C_{max} e/o del T_{max} [Jung et al., 2008]. I dati di studi *ex vivo* indicano che il robenacoxib ha una durata d'azione relativamente breve nel compartimento centrale, allorché

l'inibizione di PGE_2 al campionamento a 6 ore è risultata da debole a nulla. Al contrario la durata dell'efficacia clinica è presunta essere più lunga, in quanto il robenacoxib si concentra e si accumula con conseguente aumento del tempo di residenza nell'essudato infiammatorio [King et al., 2009]. Il legame del robenacoxib alle proteine plasmatiche è $>98\%$ sia nei cani che nei gatti, ciò indica che è presente quasi esclusivamente nel plasma con poca penetrazione nei tessuti. Inoltre, il livello del legame con le proteine plasmatiche non è concentrazione dipendente, quindi la farmacocinetica del farmaco non dovrebbe provocare delle variazioni importanti in soggetti affetti da ipoproteinemia [Jung et al., 2008].

Lo studio eseguito da King et al. (2010) che ha comparato alcune caratteristiche farmacodinamiche di alcuni FANS ad uso veterinario vs il robenacoxib, riporta i seguenti risultati::

- La selettività del robenacoxib è risultata la più alta fra tutti i FANS comparati come segue; $\text{COX-1/COX-2 IC}_{50}$ = robenacoxib (128,8) > deracoxib (48,5) > nimesulide (29,2) > carprofen (17,6) > meloxicam (7,3) > etodolac (6,6) > ketoprofen (0,88).
- Tranne l'interposizione fra etodolac e meloxicam, è risultato lo stesso ordine del punto precedente, per i rapporti di inibizione IC_{80} .
- Per gli otto farmaci è stato calcolato il grado di potenza per l'inibizione del TXA_2 sierico (indicativo per l'inibizione della COX-1). L'ordine della potenza è stato; ketoprofen > meloxicam > nimesulide > etodolac > deracoxib > robenacoxib > carprofen.

- Analogamente è stato calcolato il grado di potenza per l'inibizione della PGE_2 plasmatica (indicativo per l'inibizione della COX-2): robenacoxib > katoprofen > meloxicam > deracoxib > nimesulide > etodolac > carprofen.
- Infine è stato calcolato anche il rapporto $\text{IC}_{20} \text{TXA}_2:\text{IC}_{80} \text{PGE}_2$. Questo rapporto fornisce un utile indicatore di selettività, perché nell'uso clinico, per assicurare l'efficacia clinica è generalmente considerato appropriato il raggiungimento alla concentrazione IC_{80} della COX-2 piuttosto di quella dell' IC_{50} . Inoltre è bene che la concentrazione non superi l' IC_{20} della COX-1, per assicurare effetti collaterali minimi in relazione al tratto GI e all'omeostasi [Giraudel et al., 2005; Giraudel et al., 2009].

1.2.5.5 Cimicoxib (Cimalgex®)

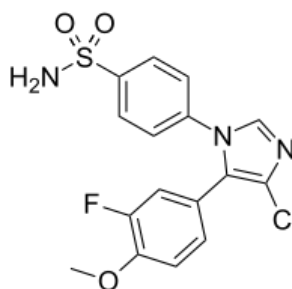


Fig.14 - Cimicoxib (Cimalgex®)

Il cimicoxib, 4-[4-chloro-5-(3-fluoro-4-methoxyphenyl)-1H-imidazol-1-yl]benzenesulfonamide, (**Fig.14**) è l'ultimo dei farmaci scoperti, appartenenti alla classe dei COXIBs, utilizzato esclusivamente in veterinaria. Il 18 febbraio 2011 la Commissione Europea EMA ha rilasciato all'azienda farmaceutica Vetoquinol un'autorizzazione all'immissione in commercio del Cimalgex, valida in tutta l'Unione europea [EMA report 2010]. Originariamente il cimicoxib veniva utilizzato per il trattamento di depressione e schizofrenia [Almansa et al., 2003], ma ha mostrato

un'attività orale comparabile ad altri coxibs quando è testato in modelli sperimentali di infiammazione, dolore acuto e cronico [Haroon et al., 2012]. Il Cimalgex viene utilizzato nel cane per il trattamento del dolore e dell'infiammazione associati all'osteoartrite ed anche nella gestione del dolore e infiammazione associati a interventi di chirurgia ortopedica o dei tessuti molli (come i muscoli). L'alta potenza in vitro sull'inibizione COX-2 è stata misurata utilizzando sangue umano intero (IC_{50} 66nM o 25 ng/mL), mentre, gli effetti in vivo sono stati dimostrati su ratti ai quali sono stati applicati modelli di iperalgesia o air-pouch oppure ai quali è stata indotta artrite [Almansa et al., 2003]. Altri studi *in vitro* hanno dimostrato una maggiore potenza del cimicoxib rispetto a rofecoxib e celecoxib [EMA report, 2009]. L'attività anti-infiammatoria e analgesica è comparabile a quella di celecoxib, rofecoxib ed altri FANS non selettivi [Sorbera e Ramis, 2004]. Il cimicoxib è disponibile sotto forma di compresse masticabili, in tre diversi dosaggi (8 mg, 30 mg e 80 mg). Per il trattamento dell'osteoartrite, le compresse devono essere somministrate al cane una volta al giorno, con o senza cibo, in dosi di 2 mg/Kg. Il trattamento può essere proseguito fino ad un massimo di 6 mesi, altrimenti è necessario il monitoraggio regolare del cane da parte del veterinario. Per il trattamento peri-operatorio, le compresse devono essere somministrate al cane circa 2 h prima dell'inizio dell'intervento, in dosi di 2 mg/Kg. Seguirà un periodo di trattamento da 3 a 7 giorni con somministrazione giornaliera delle compresse [EMA report, 2010]. Sorbera e Ramis (2004) hanno scoperto che il cimicoxib è metabolicamente più stabile del celecoxib. Nell'uomo, il cimicoxib subisce reazioni di demetilazione e successivamente coniugazione e il metabolita demetilato è inattivo su entrambi gli enzimi COX-1 e COX-2. Nel ratto, dopo somministrazione IV, l'escrezione biliare è la maggiore via di eliminazione del farmaco. Il 70 e 30% del cimicoxib è escreto rispettivamente nelle feci e nelle urine. Studi su cani Beagle, hanno riportato

una biodisponibilità del 75% dopo somministrazione orale di 1 mg/Kg con una T_{max} di 2 h e un $t_{1/2}$ di 7 h. Come nel ratto, l' escrezione biliare/intestinale è la maggiore via di eliminazione [Sorbera e Ramis, 2004]. In altri studi, il cimicoxib è stato comparato con il firocoxib, confermando una riduzione dei segni clinici della malattia, inclusi zoppia, dolore, disturbi locomotori e edema nei cani con osteoartrite cronica trattati per una durata di 90 giorni [EMA report, 2009]. Inoltre, comparato con il carprofene, il cimicoxib risulta efficace nel controllo del dolore peri-operatorio durante le prime 24 h dopo l'intervento chirurgico. Studi di tolleranza condotti per 26 settimane su cani Beagle, hanno dimostrato che gli effetti avversi sul tratto gastrointestinale e in misura minore sul rene, si evidenziano a dosi elevate (10 mg/Kg). Tuttavia, alla dose raccomandata (2 mg/Kg) non si hanno significativi effetti avversi, in particolare a livello cardiovascolare [EMA report, 2009]. In 248 cani sottoposti ad interventi chirurgici (articolari e dei tessuti molli) trattati con carprofene e cimicoxib, l'analgesia prodotta dal cimicoxib non è risultata inferiore a quella del carprofene sia nelle 24 h successive post intervento sia nel periodo di follow-up (da 16 a 168 h post intervento). Dato significativo è risultato l'inadeguata analgesia dove solo il gruppo dei cani trattati con carprofene (123 cani) ha dato tre casi rispetto al nessun caso del gruppo trattato con cimicoxib (114 cani). Circa un terzo degli animali di entrambi i gruppi ha manifestato almeno un effetto avverso (gastrointestinale, epatico, renale e cardiovascolare) [Grandemange et al., 2013].

2. Scopo della tesi

Lo scopo della presente tesi è stato quello di determinare e quantificare il Cimicoxib (CX) nel plasma di cane, dopo somministrazione orale di Cimalgex® al dosaggio di 2 e 4 mg/kg, utilizzando un nuovo metodo HPLC con un rilevatore spettro-fluorimetrico (HPLC-FL).

3. Materiali e metodi

3.1 CHIMICA E REAGENTI

Polveri pure di cimicoxib e parecoxib (PX) di purezza entrambe >99% sono state fornite rispettivamente da Vetoquinol (Bertinoro, Italia) e Pfizer (Groton, CT, USA).

- Acetonitrile (ACN), metanolo (MeOH), diclorometano (CH_2Cl_2), dietil etere (Et_2O) e n-esano (C_6H_{14}), sono stati acquistati da Merk (Darmstadt, Germany).
- Acido trifluoroacetico (CF_3COOH) è stato ottenuto da BDH (Poole, UK).
- Cloruro di potassio (KCl) e ammonio acetato (AcONH_4), sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italy).
- Acqua (H_2O) deionizzata e filtrata è stata prodotta da Milli-Q-Milli-pore Water System (Millipore, MA, USA).

I componenti acquosi ed organici della fase mobile, sono stati miscelati e filtrati automaticamente dall'HPLC attraverso filtri di membrana di acetato di cellulosa delle dimensioni di 2 μm (Sartorius Stedim Biotech S.A. Aubagne Cedex, Francia). Il medicinale Cimalgex® per il trattamento degli animali è stato comprato in una comune farmacia.

3.2 SOLUZIONI STANDARD E RETTE DI TARATURA

Sono state preparate soluzioni metanoliche delle sostanze madri di cimicoxib e dello standard interno parecoxib e diluite in metanolo in matracci volumetrici per ottenere una concentrazione finale di 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$) per ciascuna sostanza madre. Queste soluzioni metanoliche sono state conservate in freezer alla temperatura di -20°C . Successivamente, sono state effettuate ulteriori diluizioni con metanolo a partire dalle

soluzioni madri, allo scopo di ottenere concentrazioni di 50, 10, 5, e 1 µg/mL che sono state conservate a -20 °C.

A partire da queste concentrazioni, sono state fatte diluizioni acquose alle concentrazioni di 2,5, 1,25, 0,5 e 0,25 ppm. Quest'ultime sono state aggiunte a campioni di plasma di cane, testate attraverso lo strumento HPLC in ordine crescente di concentrazione e iniettate per tre volte ciascuna, al fine di ottenere una retta di taratura conseguita con il programma GraphPad Prism 4 Project versione 4.0, 2003. Sono state poi tracciate le curve di calibrazione del cimicoxib e dello standard interno attraverso le aree dei picchi riguardanti le concentrazioni (nanogrammi per millilitro) dell'analita. Le concentrazioni dei campioni sono state determinate tramite la regressione lineare, utilizzando la formula $Y = aX + c$, dove Y = area del picco, X = concentrazione dello standard in nanogrammi per millilitro, a (slope) = pendenza della curva e c = intercetta con l'asse y .

3.3 STRUMENTAZIONE E CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE

3.3.1 HPLC-FL

In questo studio è stato usato uno strumento HPLC-FL (**Fig.15**), composto da una pompa HPLC Jasco PU-2089 Plus con un rivelatore fluorimetrico Jasco FP-2020 Plus. La separazione del campione dell'analita (cimicoxib) e del suo standard interno (parecoxib), è stata eseguita tramite colonna Kinetex C_{18} di lunghezza 100mm x 4,6mm e dimensioni delle particelle 2,6µm . Le varie iniezioni sono state effettuate utilizzando un loop da 20 µL e corse da 15 minuti ciascuna. I dati sono stati processati tramite il programma BORWIN JASCO . Il tampone di acetato d'ammonio (10mM AcONH₄)

utilizzato per determinare parte della fase mobile, è stato preparato pesando esattamente 0,77 g di AcONH_4 disciolti in 1 L di acqua bi-distillata milliQ sotto agitazione meccanica. La soluzione è stata portata a pH 4.6 aggiungendo gradualmente alcune gocce di acido acetico e leggendo il valore del pH in tempo reale attraverso lo strumento PHmetro HANNA INSTRUMENTS HI 9219. La soluzione è stata conservata in frigorifero a +4 °C. La fase mobile consisteva di acetonitrile : tampone (35:65, v/v).

Lo strumento HPLC ha lavorato secondo eluizione isocratica, flusso di 1 mL/min, gain 1000 e detector impostato a lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione rispettivamente di 268 e 430 nm.

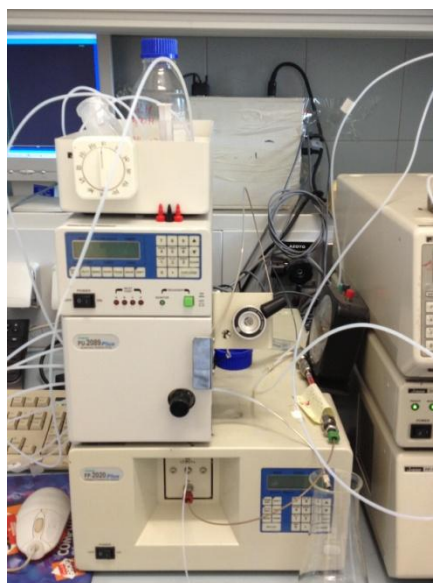


Fig.15 – *Strumento HPLC-FL utilizzato in questo studio*

3.3.2 HPLC-MS/MS

La separazione cromatografica è stata eseguita con uno strumento Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) 200 Series micro pump system, dotato di un auto-campionatore e un forno per colonna. Gli esperimenti MS sono stati effettuati con un triplo quadrupolo di massa Biosystem/Sciex (Foster City, CA, USA) API 4000, munito di una fonte di ionizzazione Turbo V elettrospray (ESI). I parametri principali sono stati: temperatura alla fonte 650 °C, voltaggio di ionspray 5.5 kV alla forma positiva dello ione (Ps) e -4.2 kV alla forma negativa (Ng), potenziale declustering 50 V in Ps e -50 V in Ng, e intervallo di massa di 50/850 Da. La corsa dell'HPLC è stata condotta usando gli stessi parametri per l'HPLC-FL descritti nel paragrafo precedente.

3.4 TRATTAMENTO DEI CANI E RACCOLTA DEI CAMPIONI

La raccolta dei campioni di sangue è stata svolta (previa l'approvazione del Comitato Etico di Pisa), presso il Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Pisa, Sezione Farmacologia e Tossicologia.

Lo studio è stato condotto previa autorizzazione dei proprietari su 5 cani di razze diverse; 2 femmine (Labrador Retriever e Border Collie) e 3 maschi (due Setter e un Golden Retriever), di età compresa tra 3 e 10 anni e peso compreso tra 16 e 30 Kg. I cani sono stati sottoposti a diverse analisi cliniche per testarne lo stato di salute. Gli animali sono stati controllati giornalmente da personale specializzato del Dipartimento per osservare eventuali effetti avversi (dall'inizio fino a una settimana dopo il completamento dell'esperimento). Due settimane dopo la fine dello studio i cani sono

stati sottoposti a un controllo sanitario per osservare se ci fossero anomalie fisiche o comportamentali.

I cani, suddivisi in due gruppi in modo random (gruppo A, n=4 e gruppo B, n=1), utilizzando la tecnica del sorteggio (5 foglietti di carta contrassegnati con i numeri da 1 a 5) sono stati tenuti a digiuno per 12 h prima e 4 h dopo la somministrazione per via orale di cimicoxib a due diversi dosaggi (gruppo A: 2 mg/kg; gruppo B: 4 mg/kg).

Procedimento: agli animali è stato applicato un catetere di 20 Gauge nella vena safena, dalla quale è stato raccolto il primo campione ematico (T_0), e in seguito sono stati somministrati 2 mg/Kg di Cimalgex® per via orale. Gli stessi cateteri sono stati utilizzati poi anche per i successivi prelievi così intervallati: 5- 15- 30- 45 min 1- 1,5- 2- 3- 4- 5- 6- 8- 10- 24 h (**Fig.16**). Prima e dopo ogni prelievo sono stati somministrati circa 2 mL di eparina allo scopo di mantenere le vene pervie. I primi 0,5 mL di sangue di ogni prelievo sono stati scartati. Tutti i campioni (2,5 mL) sono stati raccolti in provette eparinizzate e portati in laboratorio per la centrifugazione. Il plasma ottenuto dalla centrifugazione delle provette per 10 min a 3.500 rpm, è stato messo in contenitori Eppendorf da 1,5 mL e conservato a -25 °C fino al momento dell'analisi. Con lo stesso procedimento sono stati trattati tutti i cani, salvo il cane del gruppo B al quale sono stati inizialmente somministrati 4 mg/Kg di Cimalgex® invece dei 2 mg/Kg del gruppo A.

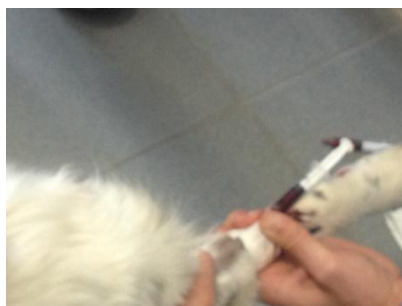


Fig.16 - *Prelievo di sangue dopo somministrazione di cimicoxib*

3.5 ESTRAZIONE

La procedura di estrazione (**Fig.17**) è stata condotta in una Eppendorf di polipropilene da 2 mL. Inizialmente sono stati portati a secco con elio, 100 μ L dello standard interno parecoxib (10 μ g/mL) a cui è stata aggiunta un'aliquota di campione di plasma (500 μ L). Dopo agitazione con vortex per 30 s, sono stati aggiunti al campione 100 μ L di CF_3COOH (10%) e 4 mg di KCl per la deproteinizzazione. Il campione è stato nuovamente vortexato per 30 s e sono stati aggiunti 600 μ L di solvente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Et}_2\text{O}$ (7:3, v/v). A questo punto, il campione è stato vortexato (30 s), agitato (60 oscillazioni/min, 7 min) e centrifugato a 14.5 xg per 10 min. Il surnatante (400 μ L) è stato raccolto in eppendorf pulite da 1,5 mL, evaporato sotto un getto delicato di elio e il residuo recuperato con 200 μ L di fase mobile. Infine 20 μ L di quest'ultima soluzione sono stati iniettati nell'HPLC-FL.

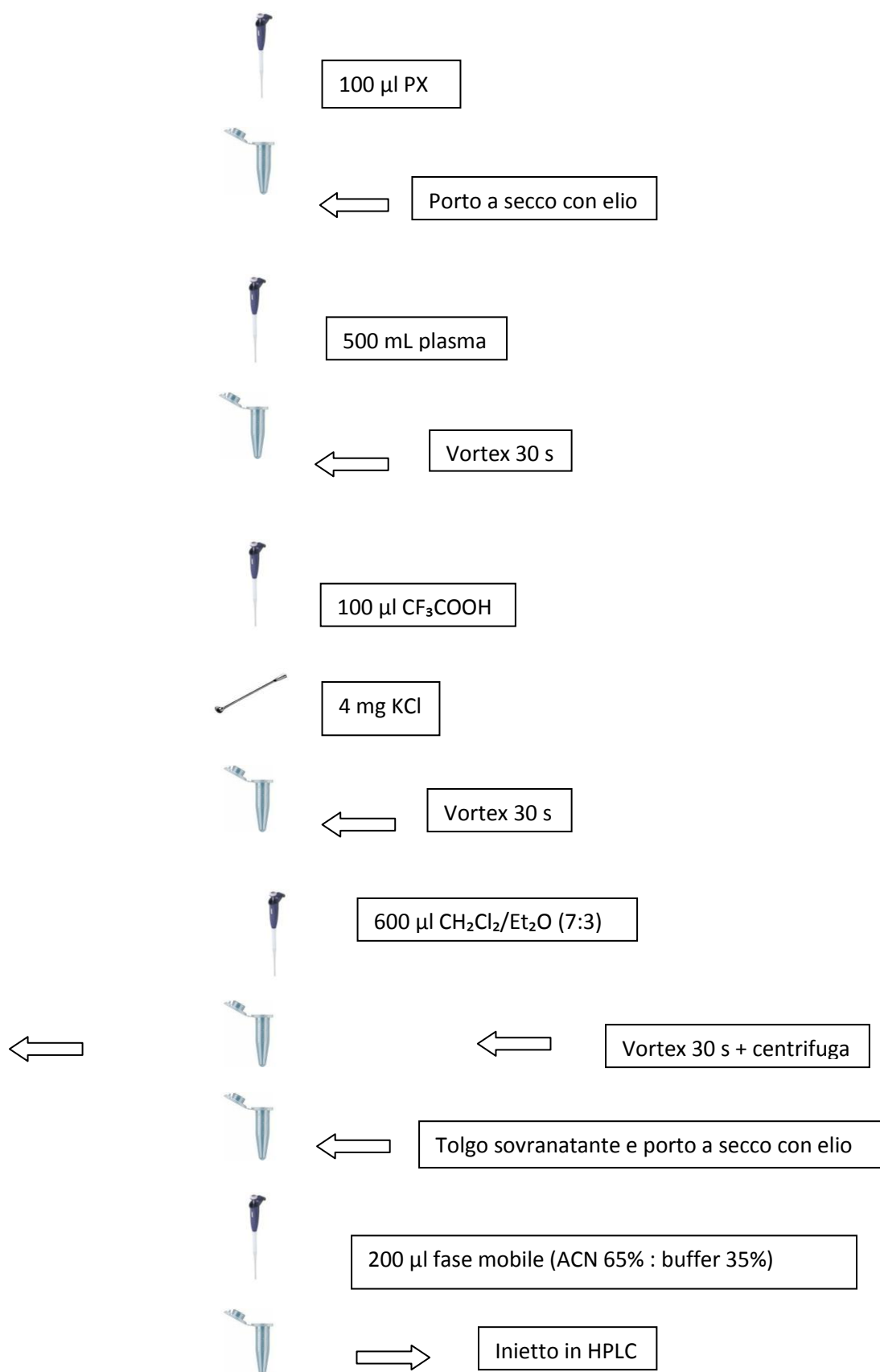


Fig.17 - Procedura di estrazione

3.6 VALIDAZIONE BIOANALITICA DEL METODO

Il metodo HPLC è stato validato, utilizzando la linea guida dell' EMEA("Guideline on Validation of Bioanalytical Methods, 2009"), in termini di linearità, limite di rivelazione (LOD), limite di quantificazione (LOQ), recupero, specificità, stabilità, precisione e veridicità. I parametri analizzati sono stati;

- *Variazione intra-day e inter-day*: è stata determinata effettuando analisi ripetute dei campioni di controllo qualità (CQ) nello stesso giorno e in giorni diversi.
- *Ripetibilità del metodo*: è stata dimostrata confrontando i risultati derivanti dall'iniezione di tre campioni a tre concentrazioni diverse di cimicoxib, per tre volte nello stesso giorno, nello stesso laboratorio, dallo stesso operatore, usando la stessa apparecchiatura e intervalli di tempo brevi.
- *LOD e LOQ*: la più bassa concentrazione di analita che può essere rilevata ma non quantificata (LOD) e la più bassa concentrazione di analita che può essere rilevata e quantificata (LOQ) sono state calcolate determinando il rapporto segnale/rumore ottenuto confrontando i segnali misurati su campioni contenenti concentrazioni note di cimicoxib con quelle di campioni bianchi.

Il valore di concentrazione corrispondente al segnale più basso misurabile sul campione con la certezza che questo segnale non possa essere scambiato per il segnale del bianco dovuto al rumore di fondo (LOD) è stato calcolato nel modo seguente;

- $\text{LOD (segnale)} = \text{valore medio dei bianchi} + 3 \text{ volte la deviazione standard dei bianchi.}$

Il valore di concentrazione corrispondente al segnale misurabile sul campione a partire dal quale si può quantificare la concentrazione del campione stesso (LOQ) è stato calcolato nel modo seguente;

- LOQ (segnale) = valore medio dei bianchi + 10 volte la deviazione standard dei bianchi.
- *Linearità del metodo*: è stata verificata attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione della curva di taratura eseguita ($r^2 > 0,99$). Il range lineare è stato valutato determinando l'intervallo di concentrazione nel quale il segnale varia linearmente con la concentrazione (area proporzionale alla concentrazione).
- *Esattezza e precisione*: sono state stimate, all'interno delle corse e tra le corse, con campioni controllo di qualità (QC), e determinate grazie ad analisi ripetute, utilizzando sette determinazioni di livelli di concentrazione differenti: LOQ (25 ng/mL), QC basso (50 e 100 ng/mL), QC intermedio (250 e 500 ng/mL), e QC alto (1000 e 2500 ng/mL).

3.7 DETERMINAZIONE DELLE CONCENTRAZIONI DI ANALITA NEI CAMPIONI

Per questo studio è stato utilizzato il metodo dello standard interno (SI) parecoxib, scelto perché appartenente alla stessa classe di farmaci della molecola analizzata, nonché per affinità strutturali, chimico-fisiche e di solubilità.

Lo standard a concentrazione nota viene aggiunto al campione stesso all'inizio dell'analisi, così che standard e campione nelle operazioni successive subiscano le

stesse perdite e siano effettivamente misurati nelle stesse condizioni. Si assume che la variazione della composizione del campione influenzi allo stesso modo il segnale proveniente da entrambi i composti (analita e SI). Questo metodo è servito nel processo di estrazione del cimicoxib, permettendo di calcolare il recupero dell'analita.

Inizialmente sono state determinate le aree dello standard interno di ciascun campione, quelle dell'analita ed eseguita la media di entrambe (Area mean PX e Area mean cimicoxib). Successivamente è stato determinato il recupero di parecoxib facendo il rapporto tra l'area dello SI e l'area della soluzione standard derivante dalla retta di taratura ($\text{rec} = \text{IS Area mean} \times 100/Y$). La percentuale relativa al recupero sta ad indicare la quantità di SI che è stato perso durante l'analisi. Il recupero di cimicoxib, definito Real Area, è stato determinato facendo il rapporto tra l'area dei picchi di cimicoxib di ciascun campione e la percentuale del recupero dello SI precedentemente calcolato ($\text{CX Real Area} = \text{CX Area mean} \times 100/\text{rec}$). Infine, mettendo in relazione la Real Area con l'equazione della retta di taratura sono stati ottenuti valori in $\mu\text{g/mL}$ a cui è stato aggiunto un fattore di correzione di 5x. Il fattore di correzione è dovuto al fatto che la soluzione iniziale costituita da 10 ppm di standard immesso in 500 mL di plasma, successivamente sottoposta ad estrazione, è stata ricostituita con 200 μL di fase mobile, ed ha determinato un'ulteriore diluizione della concentrazione cimicoxib nel campione. Il valore finale $\mu\text{g}/5$ corrisponde all'effettiva concentrazione di cimicoxib nel campione.

3.8 VALUTAZIONE FARMACOCINETICA

I calcoli farmacocinetici sono stati ottenuti utilizzando il software WinNonLin v 5.2.1 (Pharsight Corp, Sunnyvale, CA, USA). La concentrazione massima (C_{\max}) di cimicoxib nel plasma e il tempo occorrente per raggiungere la C_{\max} (T_{\max}) sono stati predetti dai dati. L'area sotto la curva (AUC) è stata calcolata seguendo la regola del trapezio [Gibaldi, Perrier, 1982].

Sono state calcolate le seguenti variabili [Wagner, 2003]:

- Concentrazione massima (C_{\max})
- Tempo per la concentrazione massima (T_{\max})
- Area sotto la curva (AUC_{0-24})
- Tempo di emivita ($T_{1/2}$)

4. Risultati

4.1 SVILUPPO DEL METODO DI RIVELAZIONE

Al fine di ottimizzare la separazione cromatografica e l'intensità degli analiti, è stato variato il pH del tampone della fase mobile (3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0). I valori di pH 3,0 e 4,0 sono stati scartati in quanto mostravano picchi asimmetrici (tailing) del CX. I valori di pH 5,0 e 6,0 sono stati scartati in quanto mostravano picchi troppo vicini alle impurezze relative al plasma e quindi poco separabili. Essendo il CX non pH sensibile e il parecoxib (PX) pH sensibile, il cambio del pH ha permesso lo slittamento a tempi di ritenzione maggiori solamente del picco dello standard interno (PX). Ciò ha permesso di allontanare nettamente i due composti consentendo una corretta separazione dei picchi cromatografici. Il valore del pH ottimale è stato quindi di 4,6.

Sono state valutate sia velocità di flussi differenti, fra 0,5 e 1,2 mL/min, usando una colonna Kinetex C18 di lunghezza 100 mm e diametro 4.6 mm con dimensioni di particelle 2.6 μ m, sia le percentuali (v/v) della fase mobile (fase organica : tampone; da 25:75% a 50:50%). La fase mobile finale è risultata ACN : AcONH₄ (10 mM) pH 4,6 (35 : 65, v/v) con un flusso di 1 mL/min. Le analisi sono state condotte sia in maniera isocratica che in gradiente. Dopo analisi dei picchi cromatografici si è preferito l'utilizzo dell'isocratica che permette un'analisi più semplice ed evita i tempi di riequilibrio della colonna. Questo risultato è stato un compromesso eccellente sia in termini di sensibilità sia di separazione dei picchi. Le lunghezze d'onda (λ) di eccitazione ed emissione sono state rispettivamente testate, all'interno degli intervalli di 250-280 e 350-380 nm. Le lunghezze d'onda rispettivamente di 269 e 430 nm, sono risultate ottimali per l'eccitazione e l'emissione, secondo scansione fluorimetrica.

Per gli standard interni (SI), sono stati valutati due composti aventi caratteristiche chimico-fisiche simili: il valdecoxib e il parecoxib (**Fig.18**).



Fig.18 – Struttura molecolare dei due composti valutati come SI (a, valdecoxib e b, parecoxib).

Fra questi, il migliore candidato con un'eccellente risoluzione e appropriato tempo di ritenzione, è stato il parecoxib. Il VX ha mostrato, in fase di sperimentazione, una minore resa, tempi di ritenzione troppo bassi e quindi poco separati da quelli del CX con accavallamento in fase cromatografica, impedendo una corretta analisi dei risultati.

4.2 OTTIMIZZAZIONE DEL METODO DI ESTRAZIONE

La deproteinizzazione del campione è stata testata con due agenti diversi: NaOH e CF₃COOH 10%. La base, ha mostrato gelificazione del campione con alcuni picchi interferenti nel tracciato cromatografico ed è stata scartata. Quindi l'acido forte, CF₃COOH è risultato il migliore. In aggiunta per migliorare la precipitazione proteica ed eliminare l'interferenza del plasma nella lettura cromatografica sono stati aggiunti 4 mg di KCl al processo di estrazione. Questo ha permesso di aumentare la forza ionica della componente acquosa del campione.

Per quanto riguarda il solvente di estrazione sono stati testati differenti solventi organici e loro miscele: Et₂O, CH₂Cl₂ e n-esano (C₆H₁₄). La miscela di CH₂Cl₂ e Et₂O è stata selezionata come il solvente più idoneo in termini di estrazione degli analiti e minimizzazione dei componenti della matrice (interferenze). Inoltre, sono state valutate, in termini di recupero e selettività, le variazioni delle proporzioni dei solventi d'estrazione prescelti (CH₂Cl₂:Et₂O, 3:7, 3:2, 7:3 v/v). Il CH₂Cl₂ : Et₂O (7:3 v/v) ha presentato il migliore recupero sia per l'analita (CX, 76 ± 5,6%) sia per lo SI (PX, 69 ± 8,6%).

Un altro aspetto ad essere valutato è stato l'influenza del numero dei cicli di estrazione sull'efficienza dell'estrazione stessa. Il tempo di estrazione è stato fissato a 10 minuti e il numero dei cicli d'estrazione è stato variato da uno a due. Il secondo ciclo ha determinato un aumento modesto del recupero (83,2 ± 12,3%), tale da non giustificare l'utilizzo di due cicli estrattivi. Quindi per assicurare un'estrazione efficiente di CX e SI, è stato selezionato un protocollo, che usava un unico ciclo di estrazione.

4.3 HPLC-FL: cromatogrammi

Lo strumento HPLC-FL ha permesso di determinare cromatogrammi specifici per ciascun campione analizzato, al fine di effettuare analisi di tipo qualitativo e quantitativo per la determinazione delle concentrazioni di CX nel plasma di cane.

Come si può osservare dalla **(Fig.19, A)**, inizialmente sono stati determinati cromatogrammi relativi alle iniezioni di plasma privo di analita e SI (bianco), caratterizzati dalla presenza di una serie di picchi individuati in un range di tempo di ritenzione di 3 minuti.

Successivamente sono state determinate curve cromatografiche di CX e SI aggiunte al plasma di cane (bianco). Queste sono state caratterizzate da due picchi ben separati, simmetrici tra loro e distanti dalle interferenze relative alla matrice. Il tempo di ritenzione del CX è stato di $4,9 \pm 0,1$ min, mentre per lo SI è stato di $9,1 \pm 0,1$ min (**Fig.19, B**).

Sono stati ottenuti infine cromatogrammi relativi a ciascun campione (**Fig.19, C**), determinati attraverso corse cromatografiche da 15 minuti ciascuna, caratterizzati anche in questo caso da due picchi ben separati tra loro, relativi al CX e allo SI, individuati a tempi di ritenzione analoghi a quelli riscontrati nei cromatogrammi dei campioni a concentrazione nota.

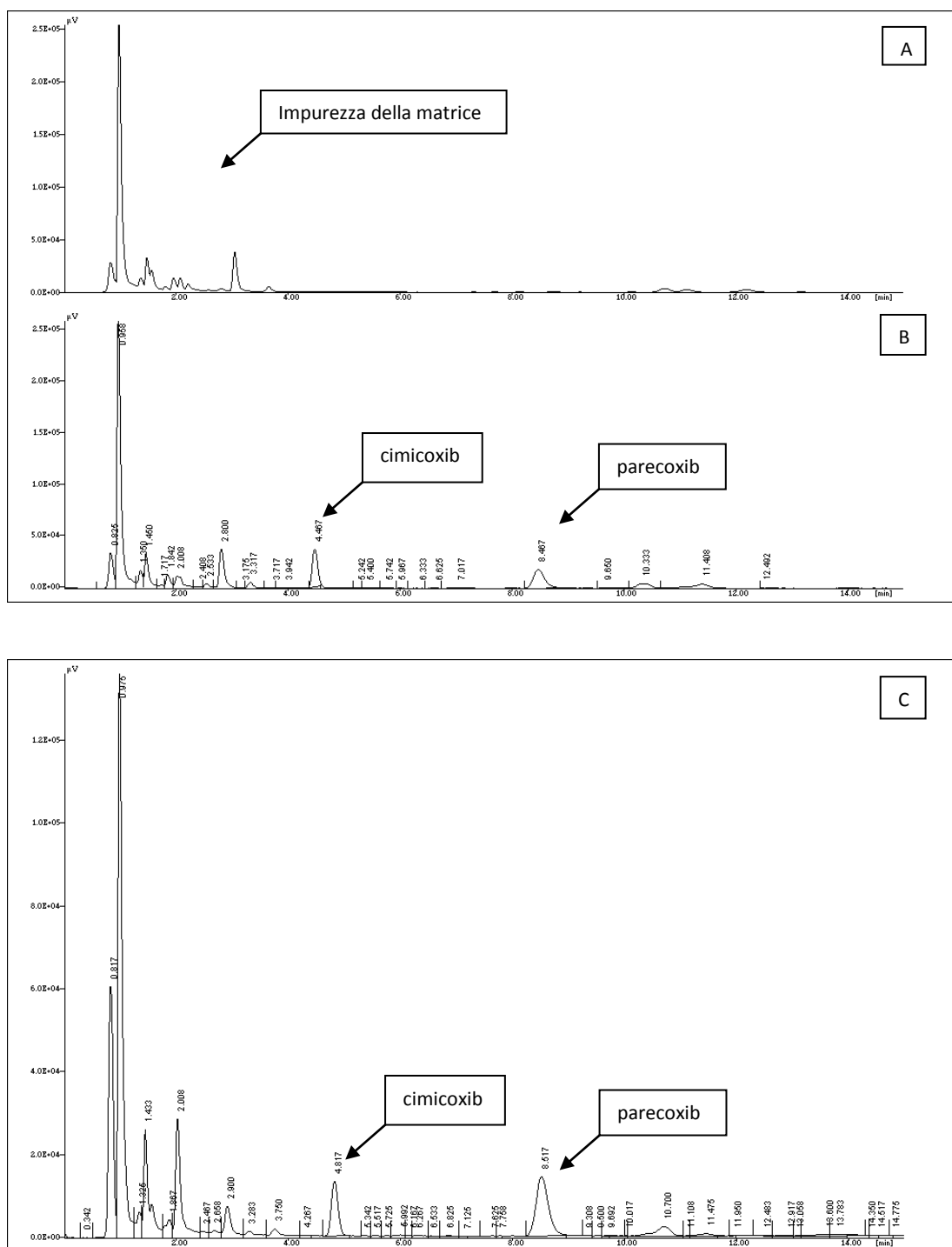


Fig.19 - (A) cromatogramma relativo al plasma di cane (bianco), (B) cromatogramma relativo a campioni di plasma di cane aggiunto con concentrazioni note di CX (0,5 ppm) e SI (0,5 ppm), (C) cromatogramma relativo a campioni di plasma di cane in seguito a trattamento (prelievo a 1 h).

La **figura 20** evidenzia l'andamento della concentrazione di CX nei campioni di plasma di cane dopo somministrazione di farmaco (2 mg/Kg) per via orale. Il primo cromatogramma a 30 min (a) mostra un picco rappresentativo di una concentrazione molto bassa di CX; il secondo cromatogramma a 2 h (b) mostra valori molto elevati di concentrazione, mentre a 24 h (c) si nota la quasi totale assenza di farmaco nel campione.

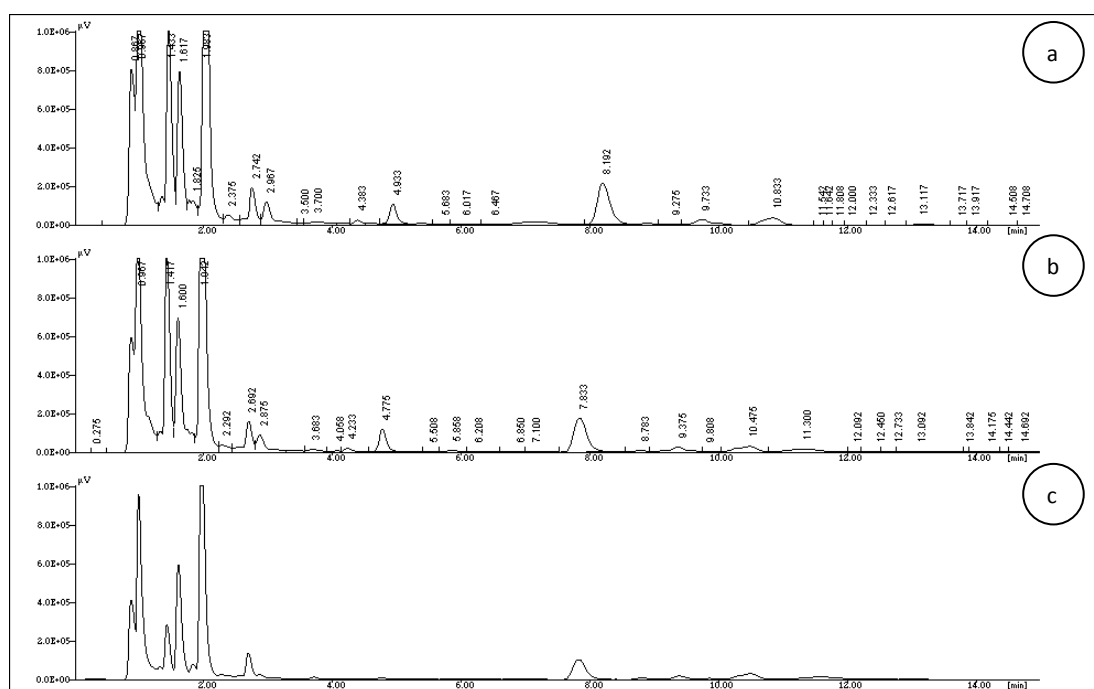


Fig.20 - Cromatogrammi rappresentativi dell'andamento della concentrazione di CX nel plasma del cane 1 dopo somministrazione orale al tempo rispettivamente di 30 min (a) con concentrazione estremamente bassa, 2 h (b) indicativo di valori molto elevati e 24 h (c) rappresentativo della minima concentrazione di CX determinata.

Da queste curve sono state determinate le aree corrispondenti a ciascun picco di CX e SI attraverso meccanismi di integrazione tra il picco trovato e la linea di base del cromatogramma. Dall'area determinata dai vari picchi cromatografici è stato possibile quantificare la concentrazione di CX espresse in $\mu\text{g/mL}$ di plasma per ciascun campione.

4.4 VALIDAZIONE DEL METODO

Per la validazione del metodo HPLC-FL, è stata utilizzata la linea guida dell'EMA (*"Guideline on Validation of Bioanalytical Methods, 2009"*).

Linearità: è stata raggiunta una buona linearità per il CX nell'intervallo da 25-2500 ng/mL. Le equazioni delle rette di regressione lineare sono riportate in **tabella 3**.

LOQ e LOD: i rapporti segnale/rumore di fondo considerati per la valutazione dei due parametri sono stati rispettivamente, 10 e 3 ng/mL (**Tab.3**).

Specificità: è stato visto che con condizioni cromatografiche ottimali, i picchi dovuti alla matrice, non hanno avuto alcuna interferenza né con lo SI, né con il CX. I tempi di ritenzione di CX e SI sono stati rispettivamente, di $9,1 \pm 0,1$ e $4,9 \pm 0,1$ min (**Fig.20**). Inoltre un'analisi LC-MS/MS dei campioni trattati ha dimostrato che sotto i picchi di CX e SI non si trovano eventuali metaboliti (**Fig.21 e 22**).

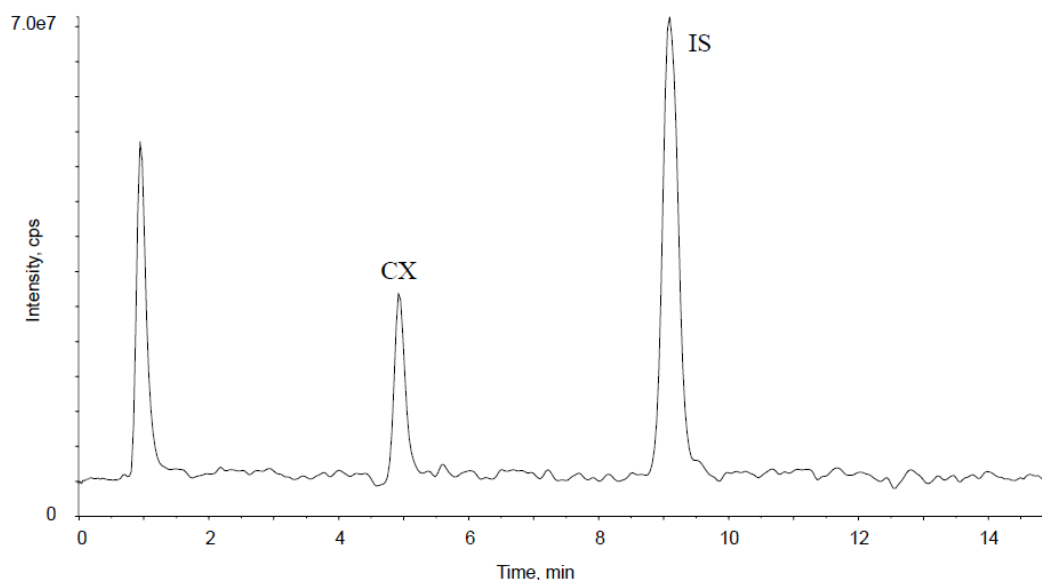


Fig.21 - Curva cromatografica eseguita con HPLC-MS/MS in un range m/z 368-385 Da di un campione reale acquisito con il metodo degli ioni negativi. Si possono chiaramente osservare i picchi del CX e del SI rispettivamente a 4,9 e 9,1 min.

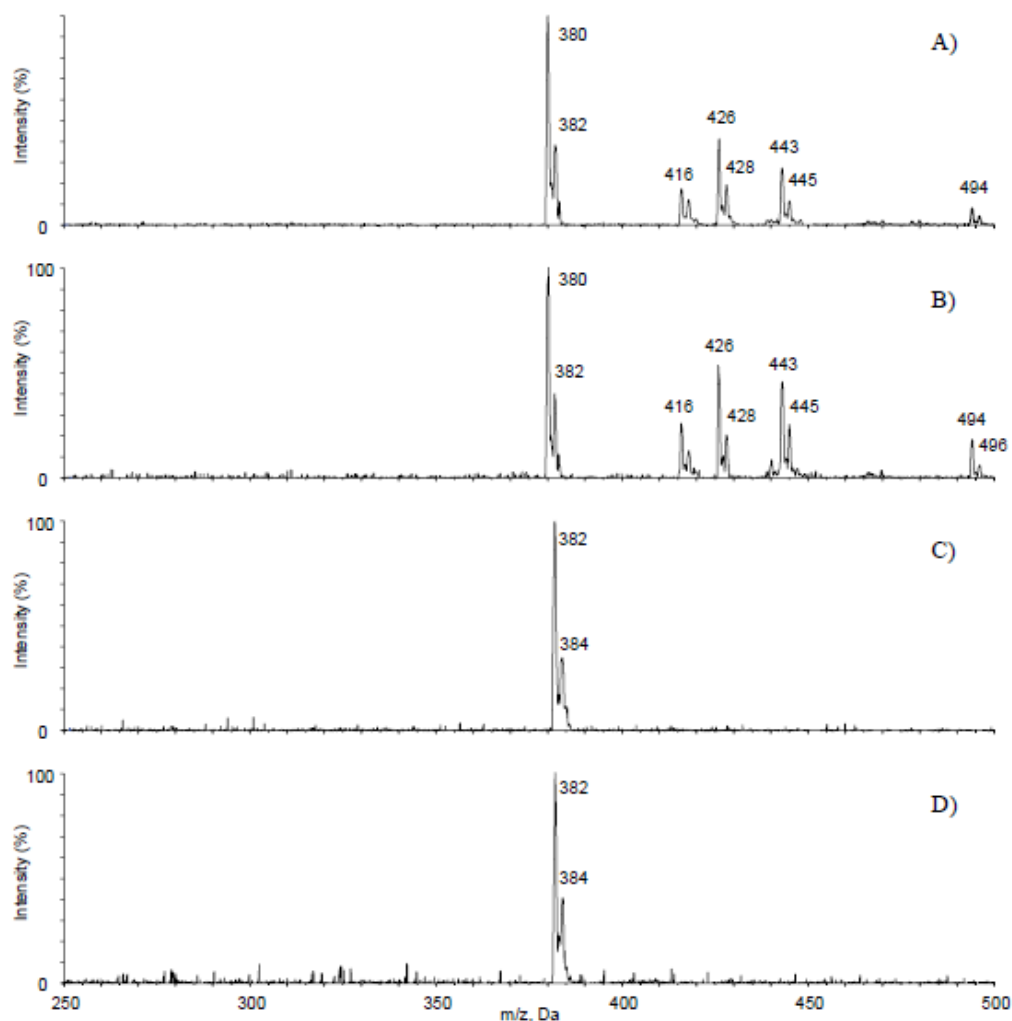


Fig.22 - Confronto attraverso lo spettro (HPLC-MS/MS) dei picchi a 4,9 min: CX bianco (A) e campione reale (B) entrambi acquisiti con il metodo degli ioni negativi; CX bianco (C) e campione reale [cani trattati con 2 mg/Kg(2h)] (D), entrambi acquisiti con il metodo degli ioni positivi.

Esattezza: il valore di ripetibilità per gli analiti, intra-day e inter-day, sono stati calcolati tramite la quantificazione di CX in cinque campioni duplicati di QC (rispettivamente, 5 controlli in una giornata e 5 controlli in 5 giorni diversi). Gli errori relativi all'esattezza sia, intra-day che inter-day sono risultati < 7%. (**Tab.3**).

Ripetibilità: allo scopo di valutare e assicurare la buona riproducibilità del metodo, sono stati eseguiti studi di stabilità. Sono state analizzate le soluzioni madre degli

analiti e dello SI (0,100 µg/mL), nonché i campioni QC (ad alta ed a bassa concentrazione). Tali soluzioni sono state esaminate in: condizioni di temperatura ambiente a breve durata, condizioni di stoccaggio a lungo termine (-20 °C), condizioni di congelamento-scongelo. La determinazione della stabilità a breve durata è stata ottenuta scongelando i campioni QC mettendoli a temperatura ambiente per 24 ore. Per la stabilità a lungo termine invece, i campioni sono stati sottoposti a -20 °C per una durata di 30 giorni. I dati raccolti dopo tre cicli di congelamento-scongelo hanno mostrato che gli analiti sono stabili nel plasma del cane (CV% < 7%). Questo risultato ha indicato che la conservazione a -20 °C degli analiti nei campioni di plasma è congrua, e quindi, non dovrebbero subentrare polemiche relative alla stabilità durante le analisi di routine per studi farmacocinetici.

Robustezza: la robustezza della metodologia è stata determinata attraverso la riproducibilità dei risultati, svolgendo la stessa metodologia analitica in diversi laboratori o sotto circostanze differenti (Laboratorio di Farmacologia Veterinaria e Laboratorio di Spettrometria di Massa, entrambi appartenenti all'Università di Pisa) ottenendo variazioni inferiori a 5,8%. I suddetti risultati dimostrano che la metodologia consente la quantificazione accurata del CX. I parametri di validazione sono in accordo con le linee guida dell'EMA [Anonymous, 2009].

PROPRIETA'	CX
Intervallo lineare (ng/mL)	10 - 2500
Equazione di calibrazione	$y = 133x + 6803$
Coefficiente di correlazione (r ²)	0,9985 ± 0,0354
LOQ (ng/mL)	10
LOD (ng/mL)	3
Esattezza	98,9 ± 4,3
Precisione (%)	
Interday	1,3 – 42,9
Intraday	2,9 – 6,1
Specificità	specifico

Tab.3 – Riassunto dei dati di validazione per il CX

4.5 FARMACOCINETICA

La somministrazione orale di 2 e 4 mg /Kg di Cimalgex® è stata ben tollerata. L'esame fisico, l'osservazione clinica e i dati ricavati da esami chimici ed ematologici, non hanno indicato nessuna reazione avversa negli animali durante e dopo lo studio.

Gruppo B 4 mg/Kg. Un solo cane (Border Collie) è stato trattato con questo dosaggio. Dopo la somministrazione di Cimalgex® in compresse masticabili, la concentrazione plasmatica è salita toccando il picco massimo di concentrazione ad un tempo T_{max} pari a 2 h, per calare in maniera progressiva fino alle 24 h (**Fig.23**).

La concentrazione massima C_{max} è stata di 846 ng/mL e l' AUC_{0-24} è stata di 6762 h ng/mL (**Tab.4**).

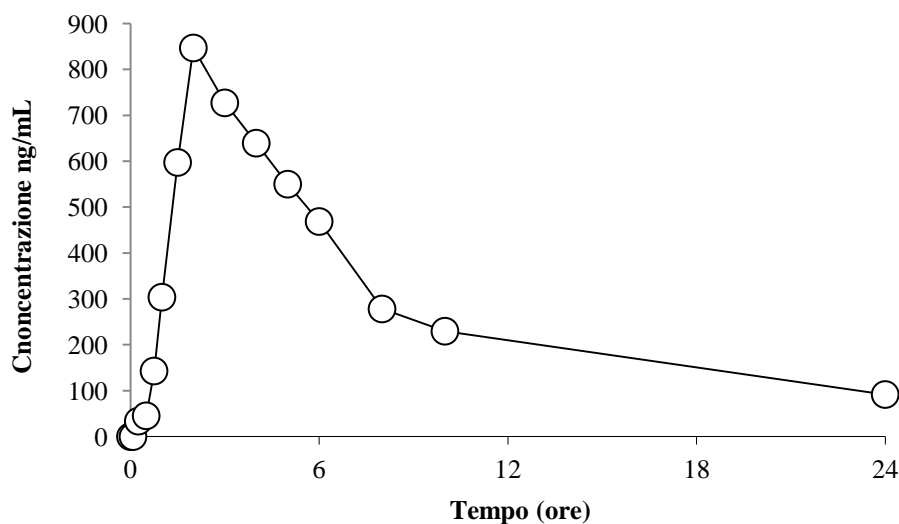


Fig.23 - Curva della concentrazione plasmatica vs tempo del CX dopo somministrazione orale di Cimalgex® a 4 mg/kg in un solo cane.

Gruppo A 2 mg/Kg. Quattro cani sono stati trattati a questo dosaggio. Dopo somministrazione di Cimalgex® in compresse masticabili, la concentrazione plasmatica è salita toccando il picco massimo di concentrazione ad un tempo T_{max} pari a $2,12 \pm 1,31$ h, per calare in maniera progressiva nelle 10 h. In un solo cane è stato possibile determinare la presenza del farmaco fino alle 24 h (**Fig.24**).

La C_{max} è stata di $479,2 \pm 74,5$ ng/mL e l' AUC_{0-24} è stata di 2891 ± 1147 h ng/mL (**Tab.4**).

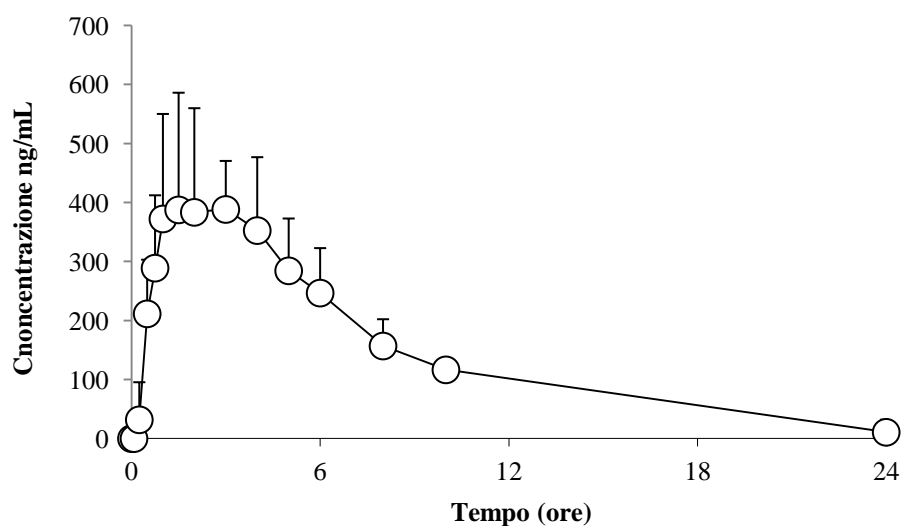


Fig.24 - Curva media della concentrazione plasmatica vs tempo del CX dopo somministrazione orale di Cimalgex® a 2 mg/kg in 4 cani.

PARAMETRI	4 mg/Kg	2 mg/Kg
R ²	0,997	0,969 ± 0,020
λ _z (1/h)	0,067	0,71 ± 0,74
t _{½ λ_z} (h)	10,20	4,47 ± 1,93
T _{max} (h)	2,00	2,12 ± 1,31
C _{max} (ng/mL)	846	479,2 ± 74,5
AUC ₀₋₂₄ (h ng/mL)	6762	2891 ± 1147

R²: coefficiente di correlazione; λ_z: costante di velocità nella parte terminale; t_{½ λ_z}: tempo di emivita terminale; T_{max}: tempo al picco; C_{max}: concentrazione plasmatica massima; AUC₀₋₂₄: area sotto la curva della concentrazione plasmatica vs tempo, estrapolata nelle 24 ore.

Tab.4 - Principali parametri farmacocinetici del CX dopo somministrazione orale di 4 mg/kg (un cane) e 2 mg/kg (4 cani).

5. Discussione

Il Cimalgex®, nome commerciale del CX, è un farmaco di recente rilascio ed attualmente commercializzato per il trattamento dell'infiammazione e del dolore nel cane. È un coxib di seconda generazione, inibitore COX-2 altamente selettivo che mostra una buona attività antinfiammatoria ed analgesica. La mancanza di studi sulla sua farmacocinetica e farmacodinamica ne limitano l'utilizzo in clinica veterinaria. Originariamente sviluppato per il trattamento della depressione e della schizofrenia nell'uomo [Almansa et al., 2013], ha mostrato (dopo somministrazione orale) attività paragonabile ad altri coxibs quando testato in modelli sperimentali per il trattamento dell'infiammazione e del dolore acuto e cronico [Rigau et al., 2003; Sorbera e Ramis, 2004].

Dopo alcuni anni di sviluppo clinico come agente antiinfiammatorio ed analgesico negli esseri umani, il CX è stato recentemente lanciato sul mercato per uso veterinario [Emmerich, 2012].

Il CX ha una bassa solubilità in acqua, è ampiamente distribuito dopo somministrazione orale, viene eliminato principalmente attraverso le feci (75%) ed è escreto per via biliare [Kim et al., 2013].

METODICA ANALITICA

La metodica sviluppata nel presente studio per la determinazione del CX è risultata valida in termini di accuratezza, precisione e robustezza in accordo con i parametri richiesti dall'EMA. La metodica in toto è risultata relativamente semplice, economica (i reagenti e la strumentazione sono stati di facile reperibilità), facilmente replicabile (non ha richiesto particolari abilità) ed intuitiva. L'HPLC con rilevatore fluorimetrico (HPLC-FL) è stato sensibile e accurato alla pari del notevolmente più costoso spettrofotometro di massa (HPLC-MS/MS) con cui vengono normalmente sviluppati

questi studi. Lo studio del CX attraverso il rilevatore FL ha permesso una riduzione dei costi, offrendo la possibilità di condurre questo tipo di analisi anche in laboratori meno attrezzati.

Il presente studio è stato sviluppato basandosi su una metodica precedentemente pubblicata in letteratura [Saccomanni et al, 2011]. Questo studio trattava altri COXIBs strutturalmente simili al CX, usati nel presente studio come standard interni (PX e VX). Sono state apportate numerose modifiche quali: il pH del tampone da 5,0 a 4,6 (in questo modo è stata possibile una corretta separazione dei picchi cromatografici), la fase mobile (per accorciare il tempo delle corse cromatografiche), il range di emissione ed eccitazione dell'HPLC-FL da 265 e 375 a 268 e 430 nm, e l'estrazione del campione. Queste modifiche, hanno permesso un miglior recupero sia dell'analita, CX, che dello standard interno, PX.

Gli standard interni sono stato scelti in base alla loro struttura chimica, stabilità in soluzione, tempo di ritenzione, valore di assorbanza e dipendenza dal pH. Non essendoci in letteratura studi disponibili a confronto, gli standard interni sono stati scelti e testati per la somiglianza molecolare con il CX. Dopo aver testato attraverso HPLC soluzioni di PX e VX singoli ed in soluzione con CX, si è preferito utilizzare come SI il PX che ha mostrato una solubilità più vicina al CX del VX, così come la risposta al detector fluorimetrico. Questa scelta è risultata ottimale sia dal punto di vista cromatografico sia per quanto riguarda la resa, la stabilità all'estrazione e le condizioni di conservazione dei campioni. Il VX è invece risultato inadatto in quanto non ha permesso una soddisfacente resa alle condizioni di estrazione, ma, cosa più importante, è stata riscontrata una sovrapposizione di picchi cromatografici che non avrebbe permesso una corretta analisi dei campioni di plasma canino.

Tutti i reagenti utilizzati nel presente studio sono stati scelti per la loro facile reperibilità, maneggevolezza e basso costo. Il LOQ è stato di 10 ng/mL e quindi soddisfacente per gli studi farmacocinetici.

Il metodo HPLC validato nella presente tesi, è stato utilizzato con successo in studi per la valutazione farmacocinetica del CX in altre specie animali (cavallo e asino) [Kim et al., 2014 a, b].

Si è preferito cominciare la sperimentazione animale su un singolo cane somministrando il farmaco alla dose doppia di quella terapeutica (4 mg/kg). Questo perché non esistevano studi di analisi farmacocinetiche nel cane e dopo somministrazione orale, le relative concentrazioni plasmatiche sarebbero potute risultare molto basse o addirittura inferiori al limite di rilevazione all'HPLC, non permettendo un'analisi corretta.

I risultati ottenuti con 4 mg/kg hanno messo in evidenza come il farmaco sia facilmente quantificabile a questo dosaggio. Il resto della sperimentazione è stata quindi condotta alla dose di 2 mg/kg con risultati più che soddisfacenti.

Il farmaco non ha mostrato effetti avversi oggettivi negli animali in studio, anche durante la somministrazione di 4 mg/kg, ovvero il doppio della dose clinica raccomandata nel cane (Vetoquinol).

Il CX è risultato dose dipendente, evidenziando, se somministrato a valori di 4 mg/kg, valori dei parametri farmacocinetici doppi rispetto a quelli derivanti dalla somministrazione del farmaco alla dose terapeutica (2 mg/kg).

Una dose singola di 2 mg/kg di Cimalgex® attraverso somministrazione orale ha mostrato caratteristiche farmacocinetiche variabili nei quattro cani trattati. Le differenze si sono rivelate in tutti i parametri calcolati. La differenza di T_{max} nei cani

trattati è risultata compresa tra 1 h e 4 h. La C_{max} è risultata nei 4 cani compresa tra 414 a 567 ng/mL. Questo può essere dovuto alle differenze di razza, età, e sesso nei cani utilizzati per la ricerca e, pertanto per uno studio più preciso sulla farmacocinetica del CX nel cane dovrebbe essere utilizzata una popolazione canina più omogenea per razza ed età od un numero di cani maggiore.

Recentemente (dopo il completamento della presente tesi) altri studi effettuati su cani Beagle, hanno evidenziato come la distribuzione di CX dopo una somministrazione orale è lineare [Jeunesse et al., 2013]. Questi dati però sono in contrasto con i risultati, non pubblicati, ottenuti da Vetoquinol che mostrano come la distribuzione del CX, dopo somministrazione orale di dosi da 1 a 4 mg/Kg, non è lineare a causa della limitata solubilità del farmaco. Il presente studio non può avvalorare nessuna delle due ricerche perché il basso numero di animali usati non permette una valutazione statistica della proporzionalità tra concentrazioni plasmatiche e dosaggio.

Nel presente studio, essendo il CX una molecola scarsamente solubile in acqua, non è stato possibile effettuare la somministrazione IV per poterne valutare il valore di biodisponibilità orale.

Un recente studio effettuato sui cani ha rilevato che il cibo non ha influenzato significativamente l'assorbimento del CX [Kim et al., 2014]. Sia a 2 mg/Kg, che a 5 mg/Kg è stato osservato un ritardo nel raggiungimento del T_{max} quando il farmaco è stato somministrato insieme al cibo, in linea con uno studio precedente relativo ad un altro farmaco antiinfiammatorio non COX-2 selettivo (fenilbutazone) nel cane [Maitho et al., 1986]. Inoltre, è stato condotto uno studio per valutare l'efficacia del CX nel controllo del dolore peri-operatorio nei cani, e si è dedotto che la somministrazione di 2 mg/Kg, una volta al giorno, per 6 giorni dopo l'intervento, è un metodo efficace e

sicuro nel controllo del dolore per cani sottoposti a chirurgia ortopedica [Grandemange et al., 2013].

6. Conclusioni

La metodica HPLC si è rivelata rapida, sensibile ed economica. Questa metodica potrà quindi essere utilizzata per studi cinetici in altre specie animali. Essa, soprattutto, vista l'esigua quantità di plasma necessario per l'analisi, potrebbe essere specificamente utilizzata per lo studio della cinetica del CX in specie animali dove non sia possibile il prelievo di larghi volumi ematici.

Le concentrazioni plasmatiche derivanti sia dal trattamento a 2 mg/Kg che da quello a 4 mg/Kg sono state sufficienti per descrivere l'intero profilo farmacocinetico nel cane.

Anche se sono necessari ulteriori studi sul farmaco in questa specie animale, appare accertato che una singola somministrazione orale di CX a 2 mg/Kg e 4 mg/Kg non produce effetti avversi oggettivi.

7. Bibliografia

- Almansa C, Bartrolí J, Belloc J, Cavalcanti FL, Ferrando R, Gómez LA, Ramis I, Carceller E, Merlos M, García-Rafanell J., 2004. New water-soluble sulfonylphosphoramidic acid derivatives of the COX-2 selective inhibitor cimicoxib. A novel approach to sulfonamide prodrugs. *J. Med. Chem.*, 47, 5579-5582.
- Anonymous, 2005. Daramaxx® (deracoxib), Flavors Tabs, full production information, Novartis. <http://deramaxx.ca/pdf/ProductLabel.pdf>.
- Anonymous, 2006. Equioxx® (firocoxib), Oral Paste for Horse, drug label, Merial. <http://www.fda.gov/download/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/DrugLabels/UCM050387.pdf>.
- Anonymous, 2007. Previcox® (firocoxib), Chewable Tablets for oral use in dog only, drug label, Meridol. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/DrugLabels/UCM050403>.
- Anonymous, 2010a, Doctors Gate, all you need to enjoy medicine, daily medical videos, cases, diagrams, animation, articles, free medical book and news. <http://doctorsgate.blogspot.com/2010/12/synthesis-of-eicosanoid-autocoids.html>.
- Anonymous, 2010b. The horse, New Products and Industry Press Releases. <http://cs.thehorse.com/blogs/press-release/archive/2010/09/30/merial-announces-introduction-of-equinoxx-174-firocoxib-injection-continuing-the-new-movement-in-equine-osteoarthritis-pain-management.aspx>.
- Anonymous, 2010c. Onsior® (robenacoxib), Allegato I, riassunto delle caratteristiche del prodotto. www.ema.europa.eu/.../document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000127/WC500067759.pdf.
- Anonymous, 2011. Trocoxil® (mavacoxib), Anneex I, summary of product characteristics. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000132/WC50069279.pdf.
- Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ, 2000. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N. Engl. J. Med.*, 343, 1520–1528.

- Bonavita V, Caltagirone C, Canonico PL, Capurso A, Cattabeni F, Diffidenti D, Pappalepore V, Pepeu G, Ravizza L, Salvini Porro G, Scapicchio PL, Senin U, Sassa V, Sorbi S, Spadin P, Spano P, Trabucchi M, Martini L, Musicco M, 2000. Malattia di Alzheimer, Documento di Consenso. Giorn. Gerontol., 48, 75-91.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL, 2002. COX-3 a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 13926–13931.
- Chavez ML, DeKorte CJ, 2003. Valdecobix: a review. Clin. Ther., 25, 817-851.
- Cox SR, Liao S, Payane-Johnson M, Zielinski RJ, Stegemann MR, 2010. Population pharmacokinetics of mavacoxib in osteoarthritic dogs. J. Vet. Pharmacol. Ther., 34, 1-11.
- Crofford LJ, 1997. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. J. Rheumatol., 49, 15-19.
- Davis JL, Marshall JF, Papich MG, Blikslager AT, Campbell NB, 2010. The pharmacokinetics and in vitro cyclooxygenase selectivity of deracoxib in horses. J. Vet. Pharmacol. Ther. 34, 12-16.
- EMEA report, 2009. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. Cimicoxib.
- Emmerich IU, 2012. New drugs for small animals in 2011. Tierarztl. Prax., 40, 351-62.
- Esser R, Berry C, Du Z, Dawson J, Fox A, Fujimoto RA, Haston W, Kimble EF, Koehler J, Peppard J, Quadros E, Quintavalle J, Toscano K, Urban L, Var Duzer J, Zhang X, Zhou S, Marshall PJ, 2005. Preclinical pharmacology of lumiracoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. Br. J. Pharmacol., 144, 538-550.
- Flower DJ, 2003. The development of COX-2 inhibitors. Nat. Rev. Drug Discov., 2, 179-191.
- Gassel AD, Tobias KM, Cox SK, 2006. Disposition of deracoxib in cats after oral administration. J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 42, 212-217.
- Gibaldi M, Perrier D, 1982. Pharmacokinetics, 2nd ed, Marcel Dekker, New York.

- Giraudel JM, Toutain PL, King JN, Lees P, 2009. Differential inhibition of cyclooxygenase isoenzymes by the NASID robenacoxib. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 32, 31-40
- Giraudel JM, Toutain PL, Lees P, 2005. Development of in vitro assays for the evaluation of cyclooxygenase inhibitors and application for predicting the selectivity of NSAIDs in the cat. *Am. J. Vet. Res.*, 66, 700-709.
- Grandemange E, Fournel S, Woehrlé F., 2013. Efficacy and safety of cimicoxib in the control of perioperative pain in dogs. *J. Small Anim. Pract.*, 54, 304-312.
- Hanson PD, Brooks KC, Case J, Conzemius M, Gordon W, Schuessler J, Shelley B, Sifferman R, Drag M, Alva R, Bell L, Romano D, Fleishman C, 2006. Efficacy and safety of firocoxib in the management of canine osteoarthritis under field condition. *Vet. Ther.*, 7, 127-140.
- Haroon E, Raison CL, Miller AH, 2012. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacol.*, 37, 137-162.
- Isakson P, Zweifel B, Masferrer J, Koboldt C, Seibert K, Hubbard R, Geis S, Needleman P, 1998. Specific COX-2 inhibitors: from bend to bedside. In: *Selective Cox-2 Inhibitors: Pharmacology. Clinical Effects and Therapeutic Potential*. Vane J, Botting J, Eds, Kluwer Academic Publisher Ed., London, UK, 127-133.
- Jeunesse EC, Schneider M, Woehrle F, Faucher M, Lefebvre HP, Toutain PL, 2013. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling for the determination of a cimicoxib dosing regimen in the dog. *BMC Vet Res*, 9, 250-64.
- Jung M, Seewald P, King J, 2008. Analytical determination and pharmacokinetics of robenacoxib in the dog. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 32, 41-48.
- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, 2009. FANS; farmaci antireumatici; antidolorifici non oppioidi e farmaci usati nella gotta. In: *Farmacologia Generale e Clinica*. Furst DE, Ulrich RW, Varkey-Altamirano C, The McGraw-Hill. Companies Ed., San Francisco, CA, USA, 672-679.
- Kim TW, Della Rocca G, Di Salvo A, Owen H, Sgorbini M, Giorgi M, 2014a. Pharmacokinetics of the novel cyclooxygenase 2 inhibitor cimicoxib in donkeys. *J. Equine Vet. Sci.*, 34, 923-925.

- Kim TW, Della Rocca G, Di Salvo A, Ryschanova R, Sgorbini M, Giorgi M, 2014b. Evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of cimicoxib in fasted and fed horses. N.Z. Vet. J., in press, DOI: 10.1080/00480169.2014.950355.
- Kim T W, Giorgi M, 2013. A brief overview of the COXIB drugs in the veterinary field. Am. J. Anim. Vet. Sci., 8, 89-99.
- Kim TW, Lebkowska-Wieruszewska B, Owen H, Yun HI, Kowalski CJ, Giorgi M, 2014. Pharmacokinetic profiles of the novel COX-2 selective inhibitor cimicoxib in dogs. J. Vet., 200, 77-81.
- King JN, Dawson J, Esser RE, Fujimoto R, Kimble EF, Maniara W, Marshall PJ, O'Byrne L, Quadros E, Toutain PL, Lees P., 2009. Preclinical pharmacology of robenacoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. J. Vet. Pharmacol. Ther., 32. 1-17.
- Kvaternick V, Pollimeier M, Fischer J, Hanson PD, 2007. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation Coxib, in horses. J. Vet. Pharmacol. Ther., 30, 208-217.
- Langford RM, Mehta V, 2006. Selective cyclooxygenase inhibition: its role in pain and anaesthesia. Bimed. Pharmacother., 60, 323-328.
- Lees P, Landoni MF, Giraudel J, Toutain PL, 2004. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. J. Vet. Pharmacol. Ther., 27, 479-490.
- Luong C, Miller A, Barrett J, Chow J, Ramesha C, Browner MF, 1996. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of the human cyclooxygenase-2. Nat. Struct. Biol., 3, 937-933.
- Maitho TE, Lees P, Taylor JB, 1986. Absorption and pharmacokinetics of phenylbutazone in Welsh Mountain ponies. J. Vet. Pharmacol. Ther., 9, 26-39.
- McCann ME, Anderson DR, Zhang D, Brideau C, Black WC, Hanson PD, Hickey G J, 2004. In vitro effects and in vitro efficacy of a novel cyclooxygenase-2 inhibitor in dogs with experimentally induced synovitis. Am. J. Vet. Res., 65, 503-512.
- Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR, 1993. Selectivity of a nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of

- constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA Proc.* 15, 90, 11693-11697.
- Rao RN, Meena S, Rao AR, 2005. An overview of the recent developments in analytical methodologies for determination of COX-2 inhibitors in bulk drugs, pharmaceuticals and biological matrices. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39, 349-363.
 - Saccomanni G, Giorgi M, Del Carlo S, Manera C, Saba A, Macchia M, 2011. Simultaneous detection and qualification of parecoxib and valdecoxib in canine plasma by HPLC with spectrofluorimetric detection: development and validation of a new methodology. *Anal. Bioanal. Chem.*, 401, 1681-1688.
 - Seibert K, Masferrer J, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Geise J, Koboldt C, Anderson G, Bremer M, Gragory S, 1995. Expression and selective inhibition of constitutive and inducible form of cyclooxygenase. *Adv. Prostaglandin. Thromboxane Leukot. Res.*, 23, 125-127.
 - Shi S, Klotz U, 2007. Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 64, 233–252.
 - Simon LS, Lanza FL, Lipsky PE, Hubbard RC, Talwalker S, Schwartz BD, Isakson PC., Geis GS, 1998. Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58365, a novel cyclooxygenase 2 inhibitor: efficacy and safety in two placebo-controlled trials in osteoarthritis and rheumatoid arthritis, and studies of gastrointestinal and platelet effects. *Arthritis Rheumtol.*, 41, 1591-1602.
 - Smith WL, Song I., 2002. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 68, 115-128.
 - Sorbera LA, Ramis I, 2004. Cimicoxib. Antiarthritic, analgesic, COX-2 inhibitor. *Drug Future*, 29, 325-330.
 - Steagall PVM, Mantovani FB, Ferreira TH, Salcedo ES, Moutinho FQ, Luna SP L, 2007. Evaluation of the adverse effects of oral firocoxib in healthy dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 30, 218-223.
 - Tacconelli S, Capone M L, Sciulli MG, Ricciotti E, Partignani P, 2002. The biochemical selectivity of novel COX-2 inhibitors in whole blood assay of COX-isozyme activity. *Curr. Med. Res. Opin.*, 18, 503-511.

- Vane JR, 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs nature. Nat. New Biol., 231, 232-235.
- Zizzadoro C, Belloli C, 2009. Sistemi degli autocodi e sua modulazione farmacologica. In: Farmacologia Veterinaria. Carli S, Ormas P, Re G, Soldani G, Eds., Idelson-Gnocchi. Ed, Napoli, Italia, 363-474.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutata nella stesura della tesi con suggerimenti, critiche ed osservazioni: a loro va la mia gratitudine.

Ringrazio anzitutto il mio relatore, il Professor Mario Giorgi e la mia correlatrice, la dottoressa Virginia De Vito: senza il loro supporto e la loro guida questa tesi non esisterebbe.

Un ringraziamento particolare va a mio zio Piero che ha speso parte del proprio tempo per leggere, discutere e correggere con me le bozze del lavoro.

Ringrazio Elisa, Rita, Irene e Vale, le compagne di studi che mi hanno rallegrato giornate altrimenti interminabili e senza le quali non sarei mai sopravvissuta a questi anni di università.

Tante sono le persone che mi sono state vicine in questi anni, ma prima di tutto ci siete voi, gli amici di sempre con cui ho condiviso questi 27 anni. Quindi grazie Silvi, Caro B, Caro I, per le innumerevoli cene/pranzi con spillacchiate al seguito e il fantastico viaggio in barca a vela, ma soprattutto Ade e Gaia, per esserci sempre state, per capirmi con uno sguardo e per volermi bene così come sono. Nene, per esserti spesso accollata me e miei "periodini" grigi e, Marghe, nella quale ho trovato una persona fantastica che non capita tutti i giorni di incontrare (capito Nico?).

Grazie a Fabio e Dario per prendermi in giro affettuosamente e strapparmi sempre un sorriso anche nei momenti "no".

Grazie a Paola e Claudio, Ale e Fabio, che è come se foste la mia seconda famiglia. Diego, Nico e Sara, i fratelli e la sorella che non ho mai avuto e con cui sono cresciuta: vi ringrazio per gli infiniti consigli e soprattutto per avermi sopportato tutti questi anni tra vacanze al mare e una sciata e l'altra.

Vorrei poi ringraziare una persona speciale, Ale, per essere entrato a far parte della mia vita, per amarmi incondizionatamente, per sostenermi in tutto quello che faccio, per essere al mio fianco e perché capisci e sopporti le mie mille ansie. Ringrazio anche la sua famiglia che mi ha accolta e accettata con affetto fin da subito.

Un ringraziamento dovuto ma che non sarà mai sufficiente per quello che fanno e hanno fatto per me, va ai miei genitori, che mi hanno sempre sostenuta moralmente, economicamente e psicologicamente e mi sono stati vicini sempre in ogni momento: a voi è dedicato questo lavoro.

Tante altre sono le persone da ringraziare, troppi motivi, ma poco lo spazio a disposizione, quindi a tutti quelli che non sono stati nominati ma sanno di meritarselo....GRAZIE!